31988L0302

30.5.1988 *EUROOPA ÜHENDUSTE TEATAJA* L 133/1

KOMISJONI DIREKTIIV,

18. november 1987,

millega üheksandat korda kohandatakse tehnika arenguga nõukogu direktiivi 67/548/EMÜ ohtlike ainete liigitamist, pakendamist ja märgistamist käsitlevate õigus- ja haldusnormide ühtlustamise kohta

(88/302/EMÜ)

EUROOPA ÜHENDUSTE KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Majandusühenduse asutamislepingut,

võttes arvesse nõukogu 27. juuni 1967. aasta direktiivi 67/548/EMÜ ohtlike ainete liigitamist, pakendamist ja märgistamist käsitlevate õigus- ja haldusnormide ühtlustamise kohta, ([1]) viimati muudetud kuuendat korda direktiiviga 79/831/EMÜ, ([2]) eriti selle artiklit 19,

ning arvestades, et:

direktiivi 67/548/EMÜ artikli 3 lõikes 1 sätestatakse, et ainete ja valmististe füüsikalis-keemilised omadused, mürgisus ja keskkonnamürgisus määratakse vastavalt V lisas määratletud meetoditele;

direktiivi 67/548/EMÜ artikli 3 lõikes 2 sätestatakse, et aine või valmistise reaalset või potentsiaalset keskkonnaohtu hinnatakse vastavalt VII ja VIII lisas esitatud tunnustele;

komisjoni direktiiviga 84/449/EMÜ ([3]) kehtestatud versiooni V lisa sisaldab praegu ainult neid katsetamismeetodeid, mis vastavad VII lisas määratletud tunnustele ja on vaja muuta kättesaadavaks katsetamismeetodid, mis vastavad VIII lisas määratletud tunnustele;

arvestades, et käesoleva direktiivi sätted on kooskõlas ohtlike ainete ja valmististe kaubanduses tehniliste tõkete kõrvaldamist käsitlevate direktiivide tehnika arengule kohandamise komitee arvamusega,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA DIREKTIIVI:

Artikkel 1

Käesoleva direktiivi lisa tekst lisatakse direktiivi 67/548/EMÜ V lisale.

Artikkel 2

Liikmesriigid võtavad enne 31. detsembrit 1988 vastu ja avaldavad käesoleva direktiivi järgimiseks vajalikud sätted ning teatavad sellest viivitamata komisjonile. Liikmesriigid kohaldavad neid sätteid hiljemalt alates 30. juunist 1989.

Artikkel 3

Käesolev direktiiv on adresseeritud liikmesriikidele.

Brüssel, 18. november 1987

Komisjoni nimel

komisjoni liige

Stanley CLINTON DAVIS

([1]) EÜT L 251, 19.9.1984, lk 1.
([2]) EÜT 196, 16.8.1967, lk 1/67.
([3]) EÜT L 259, 15.10.1979, lk 10.

LISA

Järgnevas tekstis kirjeldatud uuringumeetodid on mõeldud osade nõukogu direktiivi 79/831/EEC VIII lisas toodud toksikoloogiliste ja ökotoksikoloogiliste omaduste kindlaks tegemiseks. Käsitletud on VIII lisa 1. ja 2. tasemele vastavaid uuringumeetodid, kuid teste pole jaotatud erinevate tasemete funktsioonina.

SISUKORD

Lk

B OSA: Toksilisuse kindlaksmääramise meetodid 93

Üldine sissejuhatus: B osa 93

Subkroonilise toksilisuse test suukaudsel manustamisel: 90päevane korduvannuste suukaudse manustamise uuring näriliste liikidel 97

Subkroonilise toksilisuse test suukaudsel manustamisel: 90päevane korduvannuste suukaudse manustamise uuring mittenäriliste liikidel 101

Subkroonilise toksilisuse test nahakaudsel manustamisel: 90päevane korduvannuste nahakaudse manustamise uuring näriliste liikidel 105

Subkroonilise toksilisuse test inhaleerimisel: 90päevane korduvannuste inhalatsiooniuuring näriliste liikidel 109

Teratogeensuse uuring närilistel ja mittenärilistel 113

Kroonilise toksilisuse uuring 116

Kartsinogeensuse uuring 121

Kombineeritud kroonilise toksilisuse/kartsinogeensuse uuring 126

Ühe põlvkonna reproduktsioonitoksilisuse uuring 132

Kahe põlvkonna reproduktsioonitoksilisuse uuring 136

Toksikokineetika 140

Mutageensuse ja kartsinogeensuse uuring: 144

— Geenmutatsioon – *Saccharomyces cerevisiae*..... 144

— Mitootiline rekombinatsioon – *Saccharomyces cerevisiae*..... 147

— *In vitro* geenmutatsiooni uurimine imetajarakul 150

— DNA kahjustamine ja parandamine – plaaniväline DNA süntees – imetajate rakkudel *in vitro*..... 153

— Õdekromatiidi vahetuse *in vitro* analüüs 157

— Suguliitelise retsessiivse letaalsuse test äädikakärbsel *Drosophila melanogaster*..... 160

— Imetajaraku transformatsioonitestid *in vitro*..... 162

— Näriliste dominantse letaalsuse test 165

— *In vivo* imetajate idurakkude tsütogeneetika 168

— Hiire laikude test 171

— Hiire pärilik translokatsioon 174

C OSA: Ökotoksilisuse määramise meetodid 177

Üldsissejuhatus: C osa 177

Vetikate inhibeerimise test 178

Toksilisus vihmaussidele: Tehismulla test 184

Biodegradatsioon: Zahn-Wellensi test 188

Biodegradatsioon: Aktiivmuda simulatsioonitestid 195

Biodegradatsioon: Aktiivmuda repiratsiooni pärssimise test 207

Biodegradatsioon: Modifitseeritud SCAS test 212

B OSA: TOKSILISUSE KINDLAKSMÄÄRAMISE MEETODID

ÜLDINE SISSEJUHATUS: B OSA

PIKAAJALISED UURINGUD

Subkroonilised, kroonilised ja kartsinogeensuse uuringud

Uuritava aine ja töötlemislahuse omadused

Enne kõikide toksilisuse uuringute läbiviimist peab olema teada uuritava aine koostis, sealhulgas põhilised lisaained ja füüsikalis-keemilised omadused (sh stabiilsus).

Uuritava aine füüsikalis-keemilised omadused annavad olulist teavet manustamistee, subkrooniliste, krooniliste ja kartsinogeensuse uuringute ülesehituse ning uuritava aine käsitsemise ja säilitamise kohta.

Informatsioon keemilise struktuuri ja füüsikalis-keemiliste omaduste kohta võib samuti anda viiteid imendumise kohta plaanitava manustamistee kasutamisel ning lisada andmeid biotransformatsiooni ning kudedesse jaotumise kohta. Informatsiooni toksikokineetiliste näitajate kohta võib saada varem teostatud toksilisuse uuringutest ja toksikokineetilistest uuringutest.

Enne uuringu alustamist peaks olema kindlaks tehtud sobiv analüüsimeetod uuritava aine (ja võimaluse korral põhiliste lisaainete) kvalitatiivseks ja kvantitatiivseks määramiseks annustamiskeskkonnas ja bioloogilises materjalis.

Katseloomad: loomaliikide ja -liinide valik

Kuna loomi tuleb ravida praktiliselt kogu nende eluea vältel, peab uuringutesse kaasatud loomade pidamine olema lihtne ning nende eluiga suhteliselt lühike. Äärmiselt soovitatav on teada iseeneslikult tekkinud haiguste ja kasvajate esinemise sagedust kasutatavate loomaliinide seas, kui nende pidamistingimused on sarnased.

Loomaliinide omadused peaksid olema hästi kirjeldatavad ja neil ei tohiks esineda kaasasündinud väärarenguid. Sisearetusliinide F1 hübriidide kasutamisel on selles mõttes teatud eelised. Kui aga välisaretusliinide (kinnistest liinidest pärit loomad) kohta peaks olema taustaandmeid piisavalt, on ka need aktsepteeritavad.

Loomade hooldamine, toitmine ja jootmine

Loomkatseid ja -uuringuid tuleb läbi viia kohalike regulatsioonidega kooskõlas, arvestades humaanseid põhimõtteid ja rahvusvahelisi arenguid loomakaitse alal.

Järeldusi teha võimaldavate tulemuste puhul on kohustuslik range keskkonnatingimuste ja õige loomapidamisviisi kontroll. Mõjutegurid, nagu pidamistingimused, kaasuvad haigused, medikamentoosne ravi, lisaained toidus, õhus, vees ja magamisasemel ning loomapidamisvahendid üldiselt võivad märkimisväärselt mõjutada korduvannustega teostatud uuringute tulemusi. Üldiselt peaks kasutatavate keemiliste steriliseerimisvahendite mõju uuringule olema eelnevalt teada.

Toit peab täielikult vastama uuritava liigi toitainelistele vajadustele ega tohi sisaldada lisaaineid, mis võiksid uuringu tulemusi mõjutada. Närilisi tuleb söögi ja joogiga varustada nõudlusest lähtuvalt, uuendades toitu vähemalt üks kord nädalas. Hetkel on kasutusel kolme tüüpi loomatoite: tavaline, sünteetiline ja erinevad teada koostisega loomatoidud.

Valitud dieedist olenemata peavad varustajad kindlate ajavahemike järel kontrollima põhidieedi toiteväärtust ja saasteainete sisaldust ning edastama saadud informatsiooni laborile koos iga toidupartiiga. Äärmiselt soovitatav on, et toidurežiimi mõju ainevahetusele ning samuti kasvaja tekkesse ning looma eluea pikkusele oleks teada.

Lisaks võib teostada põhitoidu kontrollanalüüse, uurides laboratoorselt nii toidu koostisosasid kui ka võimalike saasteainete (näiteks kartsinogeenid) sisaldust. Kui see on tehtud, tuleks analüüside tulemused registreerida ja lisada iga uuritava aine lõpp-protokolli.

Teadaolevalt kartsinogeneesi mõjutavaid toidu koostisosade (näiteks antioksüdandid, küllastumata rasvhapped, seleen) sisaldus ei tohiks olla mõju avaldavas kontsentratsioonis. Kuna mitmed levinud saasteained avaldavad mõju kartsinogeensuse uuringutele, tuleb erilist tähelepanu pöörata pestitsiidijääkide, kloori orgaaniliste ühendite, polütsükliliste aromaatsete süsivesinike, östrogeenide, raskemetallide, nitroosamiinide ja mükotoksiinide sisaldusele toidus.

Kui uuritavat ainet manustatakse vee või toiduga, tuleb eelnevalt teostada stabiilsustestid. Korduvannustega läbiviidud uuringutele eelnevalt teostatud stabiilsus- ja homogeensuse teste tuleks kasutada selleks, et määrata kindlaks toidu valmistamise ja jälgimise sagedus.

Kui toitu steriliseeritakse, peaks selliste protseduuride mõju uuritavale ainele olema teada. Teostada tuleb kõik vajalikud kohandamised.

Kartsinogeensustestide puhul peaksid uurijad olema teadlikud võimalike saasteainete sisaldusest kasutatavas vees. Inimestele joogikõlbulik vesi on üldiselt sobilik ja informatsioon selle koostisest peab olema kättesaadav.

Uuritava aine kontsentratsiooni dieedis tuleb kohandada vastavalt loomade kasvule, et uuritava aine omastamine kehakaalu kohta oleks võimalikult konstantne.

Kontroll- ja uuritava dieedi toitaineline väärtus peaks olema võimalikult lähedane. Seega tuleks arvestada toidusse segatud uuritava aine toitainelist väärtust. Kogemuste põhjal ei muutu dieedi toitaineline väärtus olulisel määral, kui mitte-toitaineliste uuritavate ainete sisaldus on alla 5 %.

1. **Inhalatsiooniuuringud**

Piirtesti ei ole täpselt määratud, kuna ühekordse inhalatsiooni piirväärtuse defineerimine pole osutunud võimalikuks.

2. **Teratogeensuse uuring**

Uuringumeetod on põhiliselt suunatud suukaudsele manustamisele. Alternatiivina võib kasutada teisi manustamisteid, lähtudes uuritava aine füüsikalistest omadustest või võimalikust manustamisteest inimesele manustamisel. Sellistel juhtudel peaks uuringumeetod olema asjakohaselt kohandatud 28päevase uuringu nõuetele.

3. **Toksikokineetika**

Toksikokineetilised uuringud aitavad toksilisuse andmeid interpreteerida ja jälgida. Nende uuringute eesmärk on selgitada välja uuritava kemikaali toksilisuse teatud kindlaid aspekte ja saadud tulemused võivad olla abiks edasiste toksilisuse uuringute väljatöötamisel. Kõikidel juhtudel ei ole vaja kõiki näitajaid kindlaks teha. Vaid üksikjuhtudel on vajalik teostada täielik toksiliste uuringute seeria (imendumine, eritumine, jaotumine ja metabolism). Teatud koostisosade puhul on soovitatav seda järjestust muuta või piisab ka uuringu läbiviimisest ühekordse annusega.

Definitsioonid

Toksikokineetika:	uuritavate ainete imendumise, jaotumise, ainevahetuse ja eritumise uuring;
Imendumine:	protsess(id), mille tulemusena jõuab manustatud aine organismi;
Eritumine:	protsess(id), millega manustatud aine ja/või selle metaboliidid eritatakse organismist;
Jaotumine:	protsess(id), millega imendunud aine ja/või selle metaboliidid jaotuvad organismis;
Metabolism:	protsess(id), mille käigus toimuvad manustatud aine strukturaalsed muutused organismis kas ensümaatiliste või mitte-ensümaatiliste reaktsioonide teel.

4. **Äge ja alaäge uuring sekundaarsete liikidega**

Sekundaarsetel liikidel läbiviidud uuringu eesmärgiks on täiendada esimesest uuringust tehtud järeldusi.

Sekundaarsetel liikidel läbiviidud uuringute puhul võib kasutada juba kirjeldatud uuringumeetodeid või kohandada seda väiksemale arvule loomadele.

5. **Viljakuse uuringud**

Kui on vajalik reproduktsiooni uuring kolme põlvkonna kohta, võib kahe põlvkonna reproduktsiooni uuringu pikendada kolmanda põlvkonnani.

6. **Mutageensuse uuringud**

Täiendavad mutageensuse uuringud, muu hulgas kartsinogeensuse skriiningtestid

Direktiivi VIII lisas on ära toodud täiendavad uuringud mutageensuse edasiseks uurimiseks või kartsinogeensuse preskriinimiseks. Selles lõigus väljatoodud uuringuid võib üldiselt kasutada mõlemal juhul.

Sissejuhatus

Ainete mutageense toime esialgne hindamine koosneb geeni (punkt)mutatsioonide uurimisest bakteritel ja tsütogeenetilise kahjustuse uuringutel imetajarakkudel (*in vitro* või *in vivo*); sobivad meetodid nendeks baasuuringuteks on kirjeldatud eespool. Käesolev lõik puudutab täiendavaid uuringuid, mis sobivad baasuuringu tulemuste kinnitamiseks ja/või täiendamiseks ja mida saab kasutada mitmel erineval eesmärgil:

1. baasuuringust saadud tulemuste kinnitamiseks;

2. baasuuringus mittekäsitletud tulemusnäitajate uurimiseks;

3. *in vivo* uuringute alustamiseks või täiendamiseks.

Nimetatud eesmärkidel sisaldab rida kirjeldatud teste nii *in vitro* kui ka *in vivo* eukarüootilisi süsteeme ja laiendatud valikut bioloogilistest tulemusnäitajatest. Nendest uuringutest saab informatsiooni punktmutatsioonidest, mis leiavad aset baasuuringutes kasutatud bakteritest keerukamates organismides ja saadakse lisainformatsiooni aine potentsiaali kohta põhjustada kromosoomide aberratsioone.

Kirjeldatud on ka testid, millega uurida punktmutatsioonidele ja kromosomaalsetele aberratsioonidele lisaks teisi tulemusnäitajaid. Nendest testidest on võimalik saada täiendavat informatsiooni ja neid saab sobivuse korral lisada uuringuskeemidesse.

Kui plaanitakse edasist mutageensusuuringute programmi, peaks see üldise põhimõtte järgi olema ülesehitatud nii, et saada olulist lisainformatsiooni uuritava aine võimaliku mutageensuse ja/või kartsinogeensuse kohta.

Spetsiifilisel juhul vajalikud uuringud sõltuvad paljudest faktoritest, muuhulgas aine keemilised ja füüsikalised omadused, esialgsete bakteriaalsete ja tsütogeneetiliste testide tulemused, aine metaboolne profiil, teiste toksilisusuuringute tulemused ja aine teada kasutusalad. Seetõttu ei sobi testide kindlalt ettemääratud valik, kuna arvesse tuleb võtta mitmeid erinevaid mõjutegureid. Juhinduda võib teatud üldpõhimõtetest. Kui testi tulemus oli baasuuringus positiivne, peaksid täiendavad uuringud sisaldama vähemalt ühte testi, millega oleks võimalik kindlaks teha sama geneetilist tulemusnäitajat. Kui mõlemad testid olid baasuuringus negatiivsed, tuleks tavajuhul testid geenimutatsioonide ja samuti kromosomaalsete aberratsioonide uurimiseks viia läbi täiendavate uuringutena. Asjakohane võib olla ka lisaandmete saamine indikaatortestidest (nagu loetletud allpool).

Allpool on ära toodud sellisteks uuringuteks tehtavate meetodite grupiline alajaotus, kus lähtutakse nende peamisest geneetilisest tulemusnäitajast.

Uuringud geen(punkt)mutatsioonide kindlaks tegemiseks

Aine võimaliku geeni(punkt)mutatsioone tekitava toime edasiseks uurimiseks võivad olla vajalikud üks või enam järgnevatest testidest:

a) Otse- või pöördmutatsiooni uuringud eukarüootsetel mikroorganismidel *(Saccharomyces cerevisiae)*.

b) *In vitro* test otsemutatsioonide uurimiseks imetajarakkudel.

c) Sooga seotud retsessiivne letaalsuse uuring *Drosophila melanogaster* kärbsega.

d) *In vivo* keharaku mutatsiooni uuring: hiire üksikkatse.

Kromosoomi aberatsiooni testid

Uurimaks täiendavalt aine potentsiaalset toimet tekitada kromosoomi aberratsioone sobivad üks või mitu järgnevatest testidest:

a) *in vivo* tsütogeneetilised uuringud imetajatel.

Kaaluda tuleks *in vivo* luuüdirakkude metafaasi analüüsi läbiviimist, kui seda ei ole kaasatud esialgsesse uuringusse (baasuuringud). Lisaks võib läbi viia *in vivo* tüviraku tsütogeenetilise uuringu;

b) *in vitro* tsütogeneetilised uuringud imetajarakkudel, kui neid pole algsesse uuringukompleksi kaasatud;

c) dominantse letaalsuse uuring närilistel;

d) päriliku translokatsiooni test hiirtel.

DNA-d mõjutava toime indikaatortestid

Kasutusel on meetodid, mille abil saadakse viiteid osadele DNA mõjudele, kuid millel puudub mutageenne toime kui "tulemusnäitaja". Need uuringud võivad anda täiendavat informatsiooni mutageensusuuringutele, mis võib olla kasulik selliste uuringute interpreteerimisel. Kui sellised uuringud on vajalikud, võivad sobida üks või enam järgnevatest meetoditest, mis viiakse läbi mikroorganismidega või imetajarakkudel:

a) mitootiline rekombinatsioon *Saccharomyces cerevisiae*'s;

b) DNA kahjustamine ja parandamine – plaaniväline DNA süntees – imetajarakud (*in vitro*);

c) õdekromatiidi väljavahetamine imetajarakkudes (*in vitro*).

Teised kartsinogeensuse indikaatortestid

Kasutusel on imetajaraku transformatsiooni testid, millega hinnatakse aine võimet kutsuda rakukultuuris esile morfoloogilisi ja käitumuslikke muutusi, mida seostatakse pahaloomulisuse kujunemisega *in vivo*. Kasutada võib palju erinevaid rakutüüpe ja transformatsioonikriteeriume.

Imetajatel pärilikkuse mõjutamise riski hindamine

Kasutusel on meetodid, mille abil hinnata pärilikkuse mõjutamist kõikidel imetajatel, kui põhjuseks on geen(punkt)mutatsioonid (hiire-spetsiifiline lookuse test ([1])) või kromosoomide aberratsioonid (hiire pärilik translokatsiooni test). Neid meetodeid saab kasutada, kui hinnatakse aine võimalikke geneetilisi riske inimesele. Kuna nende testide läbiviimine on väga keerukas ja vajalik loomade arv väga suur (eriti spetsiifilise lookuse testi jaoks), peab nende testide läbiviimine on rangelt õigustatud.

([1]) Hiire spetsiifilist lookuse testi (mida ei ole käesolevas dokumendis kirjeldatud) saab kasutada tüviraku mutatsioonide hindamiseks esimeses põlvkonnas pärast mutageense ainega kokkupuudet. Kindlaks teha ja kvantitatiivselt määrata saab geneetilisi muutusi, mis põhjustavad nähtavaid muutusi fenotüübis.

SUBKROONILISE TOKSILISUSE TEST SUUKAUDSEL MANUSTAMISEL

90PÄEVANE KORDUVANNUSTE SUUKAUDSE MANUSTAMISE UURING NÄRILISTE LIIKIDEL

1. **MEETOD**

1.1. **Sissejuhatus**

Vt üldtutvustus B osa.

1.2. **Definitsioonid**

Vt üldtutvustus B osa.

1.3. **Võrdlusained**

Puuduvad.

1.4. **Uuringumeetodi põhimõte**

Uuritavat ainet manustatakse iga päev suu kaudu gradueeritud annustes mitmele katseloomade rühmale, iga uuringurühm saab eri suurusega annuse. Uuringu kestus on 90 päeva. Ravimi manustamise perioodil jälgitakse loomi iga päev, et tuvastada mürgistusnähtude ilmnemist. Katse ajal surnud loomad lahatakse, katse lõppedes surmatakse ja lahatakse kõik ellujäänud loomad.

1.5. **Kvaliteedikriteeriumid**

Puuduvad.

1.6. **Uuringumeetodi kirjeldus**

Ettevalmistused

Loomi hoitakse eksperimentaalsetes elu- ja toitumistingimustes vähemalt viis päeva enne uuringu algust. Enne katse algust terved noored loomad randomiseeritakse ning määratakse ravi- ja kontrollrühmadesse.

Uuritavat ainet võib manustada toiduga, sondi abil, kapslitena või joogiveega. Kõigile loomadele tuleb uuritavat ainet manustada samal viisil kogu uurimisperioodi vältel. Kui ennustamiseks kasutatakse vehiiklit või muid lisaaineid, peab olema tõestatud, et neil ei ole toksilist toimet. Kui see on sobilik, võib kasutada varasemaid andmeid.

Katsetingimused

Katseloomad

Vastunäidustuste puudumisel eelistatakse katseloomana rotti. Kasutada tuleks tavapärastest laboris kasvatatavatest loomaliinidest pärit noori terveid loomi, ideaalselt peaks annustamist alustama enne, kui rott saab kuuenädalaseks, kindlasti ei sobi loomad vanusega üle kaheksa nädala. Uuringu alguses ei tohiks loomade kaal erineda keskmisest rohkem kui ±20 %. Kui subkroonilise suukaudse manustamise uuring viiakse läbi pikaajalise uuringu eelfaasina, tuleks mõlemas kasutada samu loomaliike ja liine.

Arv ja sugu

Igasse annuserühma peaks kuuluma vähemalt 20 looma (10 isast ja 10 emast). Emasloomad tohi olla poeginud ega tiined. Kui osa loomi kavandatakse surmata uuringu vältel, tuleb katsealuste algarvu suurendada enne uuringu lõppu surmata plaanitud loomade arvu võrra. Peale selle võib moodustada satelliitrühma 20 loomast (10 looma kummastki soost), keda ravida suurte annustega 90 päeva ja jälgida toksiliste toimete pöörduvust, püsivust ja hilinenud avaldumist 28 päeva pärast ravi lõppu.

Annused

Kasutada tuleb vähemalt kolme erinevat annust saavat rühma ja ühte kontrollrühma. Kontrollrühma loomi tuleks kohelda sarnaselt katserühma loomadega (v.a uuritava ravimi manustamine). Kui annustamiseks kasutatakse vehiiklit, tuleks kontrollrühmale manustada vehiiklit samal viisil nagu ravirühmale ja nad peaksid seda saama võrdses koguses suurimat annust saava rühmaga. Suurima annuse korral peaks ilmnema toksiline toime, kuid surmajuhte ei tohiks olla või tekib neid vähe. Väikseim annus ei peaks põhjustama mingeid toksilisuse nähte. Kui saadaval on andmed inimese ekspositsioonist, peaks madalaim annus ületama inimesel kasutatud taset. Ideaalselt peaks keskmine annus põhjustama minimaalselt tuvastatavat toksilisust. Kui kasutatakse enam kui ühte vahepealset annusetaset, peaks nende vahed olema sellised, et tekiks toksiliste toimete astmeline suurenemine.

Väikesi ja keskmisi annuseid saavates rühmades ja kontrollrühmas peaks surmajuhte olema vähe, et tulemustest saaks teha tähenduslikke järeldusi.

Kui uuritavat ainet manustatakse koos toiduga, võib kasutada nii püsivat sisaldust toidus (ppm või mg kilogrammi toidu kohta) või püsivat annuse taset looma kehamassi kohta. Alternatiivsed kasutamisviisid tuleb täpsustada. Kui kasutatakse sondi, siis tuleb ainet manustada iga päev samadel kellaaegadel. Annuseid tuleb kohandada kindlate ajavahemike järel (üks või kaks korda nädalas), et säilitada püsiv tase looma kehamassi kohta.

Piirtest

Kui 90päevane uuring viiakse läbi eespool üksikasjalikult kirjeldatud meetodil annusega 1 000 mg/kg kehakaalu kohta päevas või kui on teada, et suurem annus ei ole inimesel põhjustanud toksilisi toimeid, pole edasine uuring vajalik. Vähese toksilisusega ainete puhul on tähtis kindlaks teha, et toiduga koos manustamisel ei mõjutaks kogused ja muud omadused normaalseid toitainete vajadusi.

Jälgimisaeg

Kõiki loomi tuleb iga päev jälgida ja kõik toksilisuse ilmingud registreerida, märkides ära nende algusaja, ulatuse ja kestuse. Registreerida tuleb samuti surmaaeg ja aeg, millal toksilisuse nähud ilmuvad või kaovad.

Protseduur

Loomadele manustatakse uuritavat ainet ideaalsel juhul seitse päeva nädalas 90 päeva jooksul. Satelliitrühmadesse kuuluvaid loomi hoitakse jälgimise eesmärgil ilma ravita järgmised 28 päeva, et tuvastada toksilise toime möödumist või püsimist.

Puuri juures tehtavad vaatlused peaksid hõlmama naha ja karvkatte, silmade ja limaskestade, aga ka hingamis-, vereringe- ning autonoomse ja tsentraalse närvisüsteemi muutusi, somatomotoorset aktiivsust ja käitumismustrit. Iga nädal tuleks mõõta toidu tarbimist (ja vedelikutarbimist, kui uuritavat ainet manustatakse joogiveega) ja loomi kaaluda.

Loomade regulaarne jälgimine on vajalik tagamaks niipalju kui võimalik, et loomad ei langeks katsest välja sellistel põhjustel nagu kannibalism, kudede autolüüs või loomade vale paigutus. Katseperioodi lõpus lahatakse kõik mitte-satelliit ravirühma kuulunud loomad. Surnud loomad tuleb eemaldada ja lahata, kui nad leitakse.

Tavalisel juhul tehakse kõigil loomadel (kaasa arvatud kontrollgruppi kuuluvatel) järgmised uuringud:

a) Oftalmoloogiline uuring tuleks teha oftalmoskoobi või sobiva samaväärse vahendi abil enne uuritava aine manustamist ja uuringu lõppedes kõigile loomadele, kuid kindlasti suuri annuseid saanud ja kontrollrühma kuulunud loomadele. Kui leitakse muutusi silmades, tuleks uurida kõiki loomi.

b) Katse lõpus tuleks uurida hematoloogilisi näitajaid, sealhulgas hematokrit, hemoglobiini kontsentratsioon, erütrotsüütide arv, leukotsüütide absoluutarv ja valem ning vere hüübimisnäitajaid, nagu näiteks hüübimisaeg, protrombiini aeg, tromboplastiini aeg või trombotsüütide arv.

c) Kliinilise biokeemia näitajaid tuleb määrata uuringu lõpus. Kõikide uuringute puhul sobivate analüüside hulka kuuluvad elektrolüütide tasakaalu, süsivesikute metabolismi, maksa- ja neerufunktsiooni kajastavad näitajad. Spetsiifiliste testide valik sõltub vaatlusandmetest uuritava aine toimeviisi kohta. Soovitatavad

analüüsid on: kaltsium, fosfor, kloriid, naatrium, kaalium, tühja kõhu glükoos (liigile kohase näljaperioodiga), seerumi glutamaatpüruvaadi transaminaas, ([1]) seerumi glutamaatoksaloatsetaadi transaminaas, ([2]) ornitiini dekarboksülaas, gammaglutamüül-transpeptidaas, uurea lämmastik, albumiin, seerumi kreatiniin, üldbilirubiin ja seerumi üldvalk. Toksilisuse adekvaatseks hindamiseks võib olla vajalik määrata järgmisi näitajaid: lipiidid, hormoonid, happe-aluse tasakaal, methemoglobiin ja koliinesteraasi aktiivsus. Kui ilmnenud toimeid on vaja põhjalikumalt uurida, võib kasutada veel teisigi kliinilise biokeemia analüüse.

d) Uriinianalüüsi ei ole vaja teha rutiinselt, vaid ainult juhul, kui see on näidustatud oodatava või ilmnenud toksilisuse tõttu.

Kui teadaolevad lähteandmed ei ole piisavad, tuleks kaaluda hematoloogiliste ja kliinilise biokeemia näitajate määramist enne annustamise algust.

Lahang

Kõikidele loomadele tuleb teostada lahang. See hõlmab keha välispinna ja kõigi kehaavauste uurimist, samuti kolju, rindkere ja kõhuõõne ja nende sisu uurimist. Maks, neerud, neerupealised ja testised tuleb kaaluda nii kiiresti kui võimalik, et vältida kuivamist.

Kõik järgmised organid või koed tuleb säilitada vastavates keskkonnatingimustes võimalikeks hilisemateks histopatoloogilisteks uuringuteks: kõik silmaganähtavad lesioonid ajukude (sealhulgas piklikaju/ajusild, väikeaju ja suuraju koore lõigud), ajuripats, kilpnääre/kõrvalkilpnääre, kõik harknäärme koed, hingetoru ja kopsud, süda, aort, (süljenäärmed), maks, põrn, neerud, neerupealised, pankreas, gonaadid, emakas (lisasugunäärmed), (nahk), söögitoru, magu, kaksteistsõrmiksool, tühi- ja niudesool, umbsool, jämesool, pärak, põis, näidis-lümfisõlmed, (emasloomal piimanäärmed), reiepiirkonna lihased, perifeerne närv, rinnak koos luuüdiga, (silmad), (reieluu, sealhulgas liigespind), (seljaaju kolmel tasemel – kaelaosa, keskmine rinnaosa, lumbaarosa) ja (ekstraorbitaalsed pisaranäärmed). Kudesid, mida on mainitud sulgudes, on vaja uurida ainult juhul, kui see on näidustatud toksilisuse ilmingute tõttu või sihtorgani haaratuse tõttu.

Histopatoloogiline uuring

a) Täielik histopatoloogiline uuring tuleb teha nende loomade organitest ja kudedest, kes kuulusid kontrollrühma või said suuri annuseid.

b) Uurida tuleb kõiki suuri lesioone.

c) Teiste annustega rühmades tuleb uurida sihtorganeid.

d) Väikese ja keskmise annuse rühmadesse kuuluvatel loomadel tuleks teostada kopsude histopatoloogilised uuringud infektsioonitunnuste suhtes, sest sel viisil on mugav hinnata loomade tervislikku seisundit. Neisse rühmadesse kuuluvatel loomadel tuleks kaaluda ka maksa ja neerude histopatoloogilise uuringu läbiviimist. Edasisi histopatoloogilisi uuringuid ei pruugi nendesse rühmadesse kuuluvatel loomadel rutiinselt vaja olla, kuid need tuleb igal juhul teostada organitel, kus suurte annuste kasutamisel täheldati lesioonide teket.

e) Kui kasutatakse satelliitrühma, tuleks histopatoloogilised uuringud teha nendel organitel, mis ravi saanutel kahjustusid.

2. ANDMED

Andmed tuleks võtta kokku tabelivormis, näidates iga katsegrupi puhul ära loomade arvu uuringu alguses, nende loomade arvu, kellel ilmnes lesioone ja iga lesiooni tüübiga loomade protsentuaalse osakaalu. Tulemusi tuleb hinnata sobiva statistilise meetodi abil. Kasutada võib ükskõik millist tunnustatud statistilist meetodit.

3. ARUANNE

3.1. Uuringu raport

Uuringu raport peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

— loomaliik, liin, päritolu, keskkonnatingimused, dieet,

— katsetingimused,

— annused (sealhulgas vehiikel, kui seda kasutatakse) ja kontsentratsioonid,

— toksilise mõju andmed soo ja annuste kaupa,

([1]) Praegu tuntud kui aspartaadi aminotransferaas.
([2]) Praegu tuntud kui alaniini aminotransferaas.

— toime puudumise tase, kui see on võimalik,
— surmaaeg uuringu ajal või kas loomad elasid kuni uuringu lõpetamiseni,
— toksiliste või muude toimete kirjeldus,
— iga normist kõrvalekalduva sümptomi ilmnemise aeg ja edasine kulg,
— andmed toidu ja kehakaalu kohta,
— oftalmoloogilised leiud,
— kasutatud hematoloogilised analüüsid ja kõik tulemused,
— kasutatud kliinilise biokeemia analüüsid ja kõik tulemused (sealhulgas kõik uriinianalüüside tulemused),
— lahanguleiud,
— histopatoloogiliste leidude detailne kirjeldus,
— tulemuste statistiline analüüs, kui see on võimalik,
— tulemuste arutelu,
— tulemuste interpretatsioon.

3.2. **Hinnang ja interpretatsioon**

Vt üldtutvustus B osa.

4. **VIITED**

Vt üldtutvustus B osa.

SUBKROONILISE TOKSILISUSE TEST SUUKAUDSEL MANUSTAMISEL

90PÄEVANE KORDUVANNUSTE SUUKAUDSE MANUSTAMISE UURING MITTENÄRILISTE LIIKIDEL

1. MEETOD

1.1. Sissejuhatus

Vt üldtutvustus B osa.

1.2. Definitsioonid

Vt üldtutvustus B osa.

1.3. Võrdlusained

Puuduvad.

1.4. Uuringumeetodi põhimõte

Uuritavat ainet manustatakse iga päev suu kaudu gradueeritud annustes mitmele katseloomade (mittenärilised) rühmale, iga uuringurühm saab eri suurusega annuse. Uuringu kestus on 90 päeva. Ravimi manustamise perioodil jälgitakse loomi iga päev, et tuvastada mürgistusnähtude ilmnemist. Katse ajal surnud loomad lahatakse, katse lõppedes surmatakse ja lahatakse kõik ellujäänud loomad.

1.5. Kvaliteedikriteeriumid

Puuduvad.

1.6. Uuringumeetodi kirjeldus

Ettevalmistused

Loomi hoitakse eksperimentaalsetes elu- ja toitumistingimustes vähemalt viis päeva enne uuringu algust. Enne katse algust terved noored loomad randomiseeritakse ning määratakse ravi- ja kontrollrühmadesse.

Uuritavat ainet võib manustada toiduga; mõnel juhul võib osutuda mugavamaks kapslitena manustamine. Kõigile loomadele tuleb uuritavat ainet manustada samal viisil kogu uurimisperioodi vältel. Kui annustamisel kasutatakse vehiiklit või muid lisaaineid, peab olema tõestatud, et neil ei ole toksilist toimet. Kui see on sobilik, võib kasutada varasemaid andmeid.

Katsetingimused

Katseloomad

Tüüpiliselt kasutataks mittenärilise liigina koera, eelistatavalt kindlast tõust. Kasutada võib ka teisi mittenäriliste liike. Kasutada tuleks noori terveid loomi, koera puhul peaks manustamist alustama nelja kuni kuue kuu vanuses ja mitte hiljem kui üheksa kuu vanuses. Kui subkroonilise suukaudse manustamise uuring viiakse läbi pikaajalise uuringu eelfaasina, tuleks mõlemas kasutada samu loomaliike/tõugusid.

Arv ja sugu

Igasse annuse tasemel peaks kasutama vähemalt kaheksat looma (4 isast ja 4 emast). Loomade arv uuringu lõpetamisel peaks olema piisav, et võimaldada toksiliste toimete tähendusrikast hindamist.

Annused

Kasutada tuleb vähemalt kolme erinevat annust saavat rühma ja ühte kontrollrühma. Kontrollrühma loomi tuleks kohelda sarnaselt katserühma loomadega (v.a uuritava ravimi manustamine). Suurima annuse korral peaks ilmnema toksiline toime, kuid surmajuhte ei tohiks olla. Väikseim annus ei peaks põhjustama mingeid toksilisuse nähte.Kui saadaval on andmed inimese ekspositsioonist, peaks madalaim annus ületama inimesel kasutatud taset. Ideaalselt peaks keskmine annus põhjustama minimaalselt tuvastatavat toksilisust. Kui kasutatakse enam kui ühte vahepealset annusetaset, peaks nende vahed olema sellised, et tekiks toksiliste toimete astmeline suurenemine.

Väikesi ja keskmisi annuseid saavates rühmades ja kontrollrühmas ei tohiks surmajuhte olla. Vähetoksiliste ainete puhul on oluline kindlustada, et kasutatav uuritava aine hulk ei häiriks normaalset toitumist.

Kui uuritavat ainet manustatakse koos toiduga, võib kasutada nii püsivat sisaldust toidus (ppm või mg kilogrammi toidu kohta) kui ka püsivat annuse taset looma kehamassi kohta; alternatiivsed kasutamisviisid tuleb täpsustada.

Kui annus manustatakse otseselt, näiteks kapsli abil, siis tuleb ainet manustada iga päev samadel kellaaegadel. Vajadusel annuseid tuleb annust kohandada nädalase intervalliga, et säilitada aine püsiv tase looma kehamassi kohta.

Kui subkroonilise manustamise uuring viiakse läbi pikaajalise uuringu eelfaasina, tuleks mõlemas kasutada sarnast dieeti.

Piirtest

Kui 90päevane uuring viiakse läbi eespool üksikasjalikult kirjeldatud meetodil annusega 1 000 mg/kg kehakaalu kohta päevas või kui on teada, et suurem annus ei ole inimesel põhjustanud toksilisi toimeid, pole edasine uuring vajalik. Vähese toksilisusega ainete puhul on tähtis kindlaks teha, et toiduga koos manustamisel ei mõjutaks kogused ja muud omadused normaalseid toitainete vajadusi.

Jälgimisaeg

Kõiki loomi tuleb iga päev jälgida ja registreerida kõik toksilisuse ilmingud märkides ära nende algusaja, ulatuse ja kestuse. Registreerida tuleb samuti surmaaeg ja aeg, millal toksilisuse nähud ilmuvad või kaovad.

Protseduur

Loomadele manustatakse uuritavat ainet ideaalsel juhul seitse päeva nädalas 90 päeva jooksul. Siiski on juhtudel, kui ravimit manustatakse muul viisil kui toidu hulka segatult, põhiliselt praktilistest kaalutlustest lähtuvalt aktsepteeritav ka viis päeva nädalas manustamine.

Vaatlus peaks hõlmama naha ja karvkatte, silmade ja limaskestade, aga ka hingamis-, vereringesüsteemi ning autonoomse ja tsentraalse närvisüsteemi muutusi, somatomotoorset aktiivsust ja käitumismustrit. Iga nädal tuleks mõõta toidu tarbimist (ja vedelikutarbimist, kui uuritavat ainet manustatakse joogiveega) ja loomi kaaluda.

Loomade hoolikas kliiniline jälgimine peab olema igapäevane ja vajadusel tuleb võtte tarvitusele sobivaid abinõusid, et vältida loomade uuringust väljalangemist. Katseperioodi lõpus kõik ellujäänud loomad lahatakse. Surevad loomad tuleb eemaldada, surmata ja lahata kohe kui nad leitakse.

Tavalisel juhul tehakse kõigil loomadel (kaasa arvatud kontrollgruppi kuuluvatel) järgmised uuringud:

a) Oftalmoloogiline uuring tuleks teha oftalmoskoobi või sobiva samaväärse vahendi abil enne uuritava aine manustamist ja uuringu lõppedes kõigile loomadele, kuid kindlasti suuri annuseid saanud ja kontrollrühma kuulunud loomadele. Kui leitakse muutusi silmades, tuleks uurida kõiki loomi.

b) Hematoloogilisi näitajaid, sealhulgas hematokrit, hemoglobiini kontsentratsioon, erütrotsüütide arv, leukotsüütide absoluutarv ja valem ning vere hüübimisnäitajaid nagu näiteks hüübimisaeg, protrombiini aeg, tromboplastiini aeg või trombotsüütide arv tuleks uurida katse alguses, seejärel kuuste intervallidega või katseaja esimese poole mööbudes ja viimaks uuringu lõpus.

c) Kliinilise biokeemia näitajaid tuleb määrata tuleks uurida katse alguses, seejärel kuuste intervallidega või katseaja esimese poole mööbudes ja viimaks uuringu lõpus. Kõikide uuringute puhul sobivate analüüside hulka kuuluvad elektrolüütide tasakaalu, süsivesikute metabolismi, maksa- ja neerufunktsiooni kajastavad näitajad. Spetsiifiliste testide valik sõltub vaatlusandmetest uuritava aine toimeviisi kohta. Soovitatavad analüüsid on: kaltsium, fosfor, kloriid, naatrium, kaalium, tühja kõhu glükoos (liigile kohase näljaperioodiga), seerumi glutamaatpüruvaattransaminaas, [1] seerumi glutamaatoksaloatsetaattransaminaas, [2] ornitiini

[1] Praegu tuntud kui aspartaadi aminotransferaas.
[2] Praegu tuntud kui alaniini aminotransferaas.

dekarboksülaas, gammaglutamüül-transpeptidaas, uurea lämmastik, albumiin, seerumi kreatiniin, üldbilirubiin ja seerumi üldvalk. Toksilisuse adekvaatseks hindamiseks võib olla vajalik määrata järgmisi näitajaid: lipiidid, hormoonid, happe-aluse tasakaal, methemoglobiin ja koliinesteraasi aktiivsus. Kui ilmnenud toimeid on vaja põhjalikumalt uurida, võib kasutada veel teisigi kliinilise biokeemia analüüse. Mittenäriliste puhul tuleb loomi enne vereanalüüside võtmist teatud aja näljas hoidma (mitte kauem kui 24 tundi).

d) Uriinianalüüsi ei ole vaja teha rutiinselt, vaid ainult juhul, kui see on näidustatud oodatava või ilmnenud toksilisuse tõttu.

Lahang

Kõikidele loomadele tuleb teostada lahang. See hõlmab keha välispinna ja kõigi kehaavauste uurimist, samuti kolju, rindkere ja kõhuõõne ja nende sisu uurimist. Maks, neerud, neerupealised ja testised tuleb kaaluda nii kiiresti kui võimalik, et vältida kuivamist.

Kõik järgmised organid või koed tuleb säilitada vastavates keskkonnatingimustes võimalikeks hilisemateks histopatoloogilisteks uuringuteks: kõik silmaganähtavad lesioonid, ajukude – sealhulgas piklikaju/ajusild, väikeaju ja suuraju korteksi lõigud, ajuripats, kilpnääre/kõrvalkilpnääre, kõik harknäärme koed, (trahhea) ja kopsud, süda, aort, süljenäärmed, maks, põrn, neerud, neerupealised, pankreas, gonaadid, emakas (lisasugunäärmed), (nahk), sapipõis, söögitoru, magu, kaksteistsõrmiksool, tühi- ja niudesool, umbsool, jämesool, pärak, kusepõis, näidis-lümfisõlmed, (emasloomal piimanäärmed), (reiepiirkonna lihased), perifeerne närv, (silmad), rinnak koos luuüdiga, (reieluu, sealhulgas liigespind) ja (seljaaju kolmel tasemel – kaelaosa, keskmine rinnaosa, lumbaarosa). Kudesid, mida on mainitud sulgudes, on vaja uurida ainult juhul, kui see on näidustatud toksilisuse ilmingute tõttu või sihtorgani haaratuse tõttu.

Histopatoloogiline uuring

Täielik histopatoloogiline uuring tuleb teha nende loomade organitest ja kudedest, kes kuulusid kontrollrühma või suuri annuseid saanud rühma. Edasised histopatoloogilised uuringud tuleb teha organitel, milles ilmnevad lesioonid suuri annuseid saavas rühmas või mille puhul see on näidustatud kliiniliste vaatluste põhjal.

2. ANDMED

Andmed tuleks võtta kokku tabelivormis, näidates iga katsegrupi puhul ära loomade arvu uuringu alguses, nende loomade arvu, kellel ilmnes lesioone, lesioonide tüübid ja iga tüübi protsentuaalse osakaalu. Tulemusi tuleb hinnata sobiva statistilise meetodi abil. Kasutada võib ükskõik millist tunnustatud statistilist meetodit.

3. ARUANNE

3.1. Uuringu raport

Uuringu raport peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

— loomaliik, liin, päritolu, keskkonnatingimused, dieet,

— katsetingimused,

— annused (sealhulgas vehiikel, kui seda kasutatakse) ja kontsentratsioonid,

— toksilise mõju andmed soo ja annuste kaupa,

— toime puudumise tase, kui see on võimalik,

— surmaaeg uuringu ajal või kas loomad elasid kuni uuringu lõpetamiseni,

— toksiliste või muude toimete kirjeldus,

— iga normist kõrvalekalduva sümptomi ilmnemise aeg ja edasine kulg,

— andmed toidu ja kehakaalu kohta,

— oftalmoloogilised leiud,

— kasutatud hematoloogilised analüüsid ja kõik tulemused,
— kasutatud kliinilise biokeemia analüüsid ja kõik tulemused (sealhulgas kõik uriinianalüüside tulemused),
— lahanguleiud,
— histopatoloogiliste leidude detailne kirjeldus,
— tulemuste statistiline analüüs, kui see on võimalik,
— tulemuste arutelu,
— tulemuste interpretatsioon.

3.2. **Hinnang ja interpretatsioon**

Vt üldtutvustus B osa.

4. **VIITED**

Vt üldtutvustus B osa.

SUBKROONILISE TOKSILISUSE TEST NAHAKAUDSEL MANUSTAMISEL

90PÄEVANE KORDUVANNUSTE NAHAKAUDSE MANUSTAMISE UURING NÄRILISTE LIIKIDEL

1. **MEETOD**

1.1. **Sissejuhatus**

Vt üldtutvustus B osa.

1.2. **Definitsioonid**

Vt üldtutvustus B osa.

1.3. **Võrdlusained**

Puuduvad.

1.4. **Uuringumeetodi põhimõte**

Uuritavat ainet manustatakse 90 päeva jooksul iga päev suu kaudu gradueeritud annustes mitmele katseloomade rühmale, iga uuringurühm saab eri suurusega annuse. Ravimi manustamise perioodil jälgitakse loomi iga päev, et tuvastada toksilisuse nähtude ilmnemist. Katse ajal surnud loomad lahatakse, katse lõppedes surmatakse ja lahatakse kõik ellujäänud loomad.

1.5. **Kvaliteedikriteeriumid**

Puuduvad.

1.6. **Uuringumeetodi kirjeldus**

Ettevalmistused

Loomi hoitakse eksperimentaalsetes elu- ja toitumistingimustes vähemalt viis päeva enne uuringu algust. Enne katse algust terved noored loomad randomiseeritakse ning määratakse ravi- ja kontrollrühmadesse. Vahetult enne uuringut pügatakse katseloomade karv kehatüvelt selja piirkonnast. Kasutada võib raseerimist, kuid seda tuleb teha umbes 24 tundi enne uuringu algust. Korduvat pügamist või raseerimist on tavaliselt vaja rakendada nädalaste intervallidega. Karva lõigates või raseerides tuleb olla ettevaatlik, et mitte nahka kriimustada. Uuritava aine manustamiseks peaks olema paljastatud vähemalt 10 % nahapinnast. Paljastamist vajava nahapinna suuruse ja katmise dimensioonide otsustamisel tuleb arvesse võtta looma kaalu. Tahkete ainete manustamisel pulverisaatoriga, kui see on sobilik, tuleb uuritavat ainet piisavalt niisutada veega või vajadusel sobiva kandeainega, et kindlustada head kontakti nahaga. Vedelaid aineid kasutatakse tavaliselt ilma lahjendamata. Kasutatakse igapäevast manustamist viiest kuni seitsme päevani nädalas.

Katsetingimused

Katseloomad

Kasutada tuleks täiskasvanud rotte, küülikuid või merisigu. Teisi liike võib kasutada, kuid selline otsus peab olema põhjendatud. Uuringu alguses ei tohiks loomade kaal erineda keskmisest rohkem kui ±20 %. Kui subkroonilise nahakaudse manustamise uuring viiakse läbi pikaajalise uuringu eelfaasina, tuleks mõlemas kasutada samu loomaliike ja liine.

Arv ja sugu

Igasse annuserühma peaks kuuluma vähemalt 20 terve nahaga looma (10 isast ja 10 emast). Emasloomad tohi olla poeginud ega tiined. Kui osa loomi kavandatakse surmata uuringu vältel, tuleb katsealuste algarvu suurendada enne uuringu lõppu surmata plaanitud loomade arvu võrra. Peale selle võib moodustada satelliitrühma 20 loomast (10 looma kummastki soost), keda ravida suurte annustega 90 päeva ja jälgida toksiliste toimete pöörduvust, püsivust ja hilinenud avaldumist 28 päeva pärast ravi lõppu.

Annused

Kasutada tuleb vähemalt kolme erinevat annust saavat rühma ja ühte kontrollrühma või vehiikli kontrollrühma, kui kasutatakse vehiiklit. Uuritavat ainet tuleks manustada iga päev samal ajal ja annuseid tuleb kohandada kindlate ajavahemike järel (üks või kaks korda nädalas), et säilitada püsiv tase looma kehamassi kohta. Kontrollrühma loomi tuleks kohelda sarnaselt katserühma loomadega (v.a uuritava ravimi manustamine). Kui annustamiseks kasutatakse vehiiklit, tuleks kontrollrühmale manustada vehiiklit samal viisil nagu ravirühmale ja nad peaksid seda saama võrdses koguses suurimat annust saava rühmaga. Suurima annuse korral peaks ilmnema toksiline toime, kuid surmajuhte ei tohiks olla või tekib neid vähe. Väikseim annus ei peaks põhjustama mingeid toksilisuse nähte. Kui saadaval on andmeid inimese ekspositsioonist, peaks madalaim annus ületama inimesel kasutatud taset. Ideaalselt peaks keskmine annus põhjustama minimaalset tuvastatavat toksilisust. Kui kasutatakse enam kui ühte vahepealset annusetaset, peaks nende vahed olema sellised, et tekiks toksiliste toimete astmeline suurenemine. Väikesi ja keskmisi annuseid saavates rühmades ja kontrollrühmas peaks surmajuhte olema vähe, et tulemustest saaks teha tähenduslikke järeldusi.

Kui uuritava aine manustamine põhjustab tõsist nahaärritust, tuleb kontsentratsiooni vähendada. See võib kaasa tuua toksiliste toimete vähenemise või puudumise suure annuse rühmas. Kui nahk on raskelt kahjustunud, võib osutuda vajalikuks uuring lõpetada ja alustada uut uuringut madalamate kontsentratsioonidega.

Piirtest

Kui eelnev uuring annusega 1 000 mg/kg kehakaalu kohta päevas või teadaolev inimese ekspositsioon sellest suuremale annusele ei ole põhjustanud toksilisi toimeid, pole edasine uuring vajalik.

Jälgimisaeg

Katseloomi tuleb iga päev jälgida toksilisuse ilmingute suhtes. Registreerida tuleb surma aeg ja aeg, millal toksilisuse nähud ilmuvad või kaovad.

Protseduur

Loomad peavad olema kambrites ühekaupa. Loomadele manustatakse uuritavat ainet ideaalsel juhul seitse päeva nädalas 90 päeva jooksul.

Satelliitrühmadesse kuuluvaid loomi hoitakse jälgimiseks ilma ravita järgmised 28 päeva, et tuvastada toksilise toime möödumist või püsimist. Ekspositsiooni aeg peab olema kuus tundi päevas.

Uuritavat ainet tuleb manustada ühtlaselt nahapiirkonnale suurusega umbes 10 % kehapinnast. Väga toksiliste ainete puhul võib kasutada väiksemat nahapinda, kui üldiselt tuleks katta nii suur ala kui võimalik võimalikult õhukese ja ühtlase kihiga.

Ekspositsiooniaja jooksul hoitakse uuritavat ainet nahaga kontaktis poorse marlisideme ja mitteärritava teibiga. Manustamiskohta tuleb katta sobival viisil, et hoida side ja uuritav aine paigal ja kindlustada, et loomad ei saaks uuritavat ainet alla neelata. Uuritava aine allaneelamise vältimiseks võib kasutada piiravaid vahendeid, kui täielik immobilisatsioon ei ole soovitatav meetod.

Ekspositsiooniaja lõpus tuleb uuritava aine jäägid nahalt kõrvaldada, kui see on rakendatav. Puhastamiseks kasutatakse vett või mõnda muud sobivat nahapuhastamise meetodit.

Kõiki loomi tuleb jälgida iga päev ja registreerida toksilisuse ilmingud, sealhulgas algusaeg, ulatus ja kestus. Puuri juures tehtavad vaatlused peaksid hõlmama naha ja karvkatte, silmade ja limaskestade, aga ka hingamis-, vereringe- ning autonoomse ja tsentraalse närvisüsteemi muutusi, somatomotoorset aktiivsust ja käitumismustrit. Iga nädal tuleks mõõta toidu tarbimist ja loomi kaaluda. Loomade regulaarne jälgimine on vajalik tagamaks niipalju kui võimalik, et loomad ei langeks katsest välja sellistel põhjustel nagu kannibalism, kudede autolüüs või loomade vale paigutus. Katseperioodi lõpus lahatakse kõik mitte-satelliit ravirühma kuulunud loomad. Surevad loomad tuleb eemaldada, surmata ja lahata, kui nad leitakse.

Tavalisel juhul tehakse kõigil loomadel (kaasa arvatud kontrollgruppi kuuluvatel) järgmised uuringud:

a) Oftalmoloogiline uuring tuleks teha oftalmoskoobi või sobiva samaväärse vahendi abil enne kokkupuudet uuritava ainega ja uuringu lõppedes kõigile loomadele, kuid kindlasti suuri annuseid saanud ja kontrollrühma kuulunud loomadele. Kui leitakse muutusi silmades, tuleks uurida kõiki loomi.

b) Katse lõpus tuleks uurida hematoloogilisi näitajaid, sealhulgas hematokrit, hemoglobiini kontsentratsioon, erütrotsüütide arv, leukotsüütide absoluutarv ja valem ning vere hüübimisnäitajaid, nagu näiteks hüübimisaeg, protrombiini aeg, tromboplastiini aeg või trombotsüütide arv.

c) Kliinilise biokeemia näitajaid tuleb määrata uuringuperioodi lõpus. Kõikide uuringute puhul sobivate analüüside hulka kuuluvad elektrolüütide tasakaalu, süsivesikute metabolismi, maksa- ja neerufunktsiooni kajastavad näitajad. Spetsiifiliste testide valik sõltub vaatlusandmetest uuritava aine toimeviisi kohta. Soovitatavad analüüsid on: kaltsium, fosfor, kloriid, naatrium, kaalium, tühja kõhu glükoos (liigile kohase näljaperioodiga), seerumi glutamaatpüruvaadi transaminaas, ([1]) seerumi glutamaatoksaloatsetaadi transaminaas, ([2]) ornitiini dekarboksülaas, gammaglutamüül-transpeptidaas, uurea lämmastik, albumiin, seerumi kreatiniin, üldbilirubiin ja üldvalk.

Toksilisuse adekvaatseks hindamiseks võib olla vajalik määrata järgmisi näitajaid: lipiidid, hormoonid, hapealus tasakaal, methemoglobiin ja koliinesteraasi aktiivsus. Kui ilmnenud toimeid on vaja põhjalikumalt uurida, võib kasutada veel teisigi kliinilise biokeemia analüüse.

d) Uriinianalüüsi ei ole vaja teha rutiinselt, vaid ainult juhul, kui see on näidustatud oodatava või ilmnenud toksilisuse tõttu.

Kui teadaolevad lähteandmed ei ole piisavad, tuleks kaaluda hematoloogiliste ja kliinilise biokeemia näitajate määramist enne annustamise algust.

Lahang

Kõikidele loomadele tuleb teostada täielik lahang, mis hõlmab keha välispinna ja kõigi kehaavauste uurimist, samuti kolju, rindkere ja kõhuõõne ja nende sisu uurimist. Maks, neerud, neerupealised ja testised tuleb kaaluda nii kiiresti kui võimalik, et vältida kuivamist. Kõik järgmised organid või koed tuleb säilitada vastavates keskkonnatingimustes võimalikeks hilisemateks histopatoloogilisteks uuringuteks: ajukude, sealhulgas piklikaju/ajusild, väikeaju ja suuraju korteksi lõigud, ajuripats, kilpnääre/kõrvalkilpnääre, kõik harknäärme koed, hingetoru ja kopsud, süda, aort, süljenäärmed, maks, põrn, neerud, neerupealised, pankreas, gonaadid, emakas lisasugunäärmed, sapipõis (kui see on olemas), söögitoru, magu, kaksteistsõrmiksool, tühi- ja niudesool, umbsool, jämesool, pärak, põis, näidis-lümfisõlmed, (emasloomal piimanäärmed), (reiepiirkonna lihaskond), perifeerne närv, (silmad), rinnak koos luuüdiga, (reieluu, sealhulgas liigespind), (seljaaju kolmel tasemel – kaelaosa, keskmine rinnaosa, lumbaarosa) ja (ekstraorbitaalsed pisaranäärmed). Kudesid, mida on mainitud sulgudes, on vaja uurida ainult juhul, kui see on näidustatud toksilisuse ilmingute tõttu või sihtorgani haaratuse tõttu.

Histopatoloogiline uuring

a) Täielik histopatoloogiline uuring tuleb teha kontrollrühma või suuri annuseid saanud rühma kuulunud loomade normaalsest ja ravitud nahast ja organitest ja kudedest.

b) Uurida tuleb kõiki silmaganähtavaid lesioone.

c) Teiste annustega rühmades tuleb uurida sihtorganeid.

d) Kui kasutatakse rotte, tuleks väikese ja keskmise annuse rühmadesse kuuluvatel loomadel teostada kopsude histopatoloogilised uuringud infektsioonitunnuste suhtes, sest sel viisil on mugav hinnata loomade tervislikku seisundit. Edasisi histopatoloogilisi uuringuid ei pruugi nendesse rühmadesse kuuluvatel loomadel rutiinselt vaja olla, kuid need tuleb igal juhul teostada organitel, kus suurte annuste kasutamisel täheldati lesioonide teket.

e) Kui kasutatakse satelliitrühma, tuleks histopatoloogilised uuringud teha nendel organitel, mis ravi saanutel kahjustusid.

2. **ANDMED**

Andmed tuleks võtta kokku tabelivormis, näidates iga katsegrupi puhul ära loomade arvu uuringu alguses, nende loomade arvu, kellel ilmnes lesioone ja lesioonide tüübid ja iga tüübi protsentuaalse osakaalu. Tulemusi tuleb hinnata sobiva statistilise meetodi abil. Kasutada võib ükskõik millist tunnustatud statistilist meetodit.

([1]) Praegu tuntud kui aspartaadi aminotransferaas.
([2]) Praegu tuntud kui alaniini aminotransferaas.

3. **ARUANNE**

3.1. **Uuringu raport**

Uuringu raport peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

— loomaliik, liin, päritolu, keskkonnatingimused, dieet,
— katsetingimused,
— annused (sealhulgas vehiikel, kui seda kasutatakse) ja kontsentratsioonid,
— toksilise mõju andmed soo ja annuste kaupa,
— toime puudumise tase, kui see on võimalik,
— surmaaeg uuringu ajal või kas loomad elasid kuni uuringu lõpetamiseni,
— toksiliste või muude toimete kirjeldus,
— iga normist kõrvalekalduva sümptomi ilmnemise aeg ja edasine kulg,
— andmed toidu ja kehakaalu kohta,
— oftalmoloogilised leiud,
— kasutatud hematoloogilised analüüsid ja kõik tulemused,
— kasutatud kliinilise biokeemia analüüsid ja kõik tulemused (sealhulgas kõik uriinianalüüside tulemused),
— lahanguleiud,
— histopatoloogiliste leidude detailne kirjeldus,
— tulemuste statistiline analüüs, kui see on võimalik,
— tulemuste arutelu,
— tulemuste interpretatsioon.

3.2. **Hinnang ja interpretatsioon**

Vt üldtutvustus B osa.

4. **VIITED**

Vt üldtutvustus B osa.

SUBKROONILISE TOKSILISUSE TEST INHALEERIMISEL

90PÄEVANE KORDUVANNUSTE INHALATSIOONIUURING NÄRILISTE LIIKIDEL

1. **MEETOD**

1.1. **Sissejuhatus**

Vt üldtutvustus B osa.

1.2. **Definitsioonid**

Vt üldtutvustus B osa.

1.3. **Võrdlusained**

Puuduvad.

1.4. **Uuringumeetodi põhimõte**

Uuritavale ainele gradueeritud kontsentratsioonides eksponeeritakse iga päev kindlal ajavahemikul mitut katseloomade rühma. Iga kontsentratsiooni kasutatakse ühel uuringurühmal. Uuringu kestus on 90 päeva. Kui kasutatakse vehiiklit, et aidata kaasa vajaliku kontsentratsiooni saavutamisele atmosfääris, tuleks kasutada veel vehiikli kontrollrühma. Ravimi manustamise perioodil jälgitakse loomi iga päev, et tuvastada mürgistusnähtude ilmnemist. Katse ajal surnud loomad lahatakse; katse lõppedes surmatakse ja lahatakse kõik ellujäänud loomad.

1.5. **Kvaliteedikriteeriumid**

Puuduvad.

1.6. **Uuringumeetodi kirjeldus**

Ettevalmistused

Loomi hoitakse eksperimentaalsetes elu- ja toitumistingimustes vähemalt viis päeva enne uuringu algust. Enne katse algust terved noored loomad randomiseeritakse ning määratakse ravi- ja kontrollrühmadesse. Vajadusel võib uuritavale ainele lisada vehiikli, mis aitab tekitada uuritava aine sobilikku kontsentratsiooni õhus. Kui annustamiseks kasutatakse vehiiklit või teisi lisaaineid, peab olema teada, et neil ainetel ei ole toksilist toimet. Kui see on sobilik, võib kasutada varasemaid andmeid.

Katsetingimused

Katseloomad

Vastunäidustuste puudumisel eelistatakse katseloomana rotti. Kasutada tuleks tavapärastest laboris kasvatatavatest loomaliinidest pärit noori terveid loomi. Uuringu alguses ei tohiks loomade kaal erineda keskmisest rohkem kui ±20 %. Kui subkrooniline inhalatsiooniuuring viiakse läbi pikaajalise uuringu eelfaasina, tuleks mõlemas kasutada samu loomaliike ja liine.

Arv ja sugu

Igasse annuserühma peaks kuuluma vähemalt 20 looma (10 isast ja 10 emast). Emasloomad tohi olla poeginud ega tiined. Kui osa loomi kavandatakse surmata uuringu vältel, tuleb katsealuste algarvu suurendada enne uuringu lõppu surmata plaanitud loomade arvu võrra. Peale selle võib moodustada satelliitrühma 20 loomast (10 looma kummastki soost), keda ravitakse suurte annustega 90 päeva ja jälgitakse toksiliste toimete pöörduvust, püsivust ja hilinenud avaldumist 28 päeva pärast ravi lõppu.

Annused

Kasutada tuleb vähemalt kolme erinevat annust saavat rühma ja ühte kontrollrühma või vehiikli kontrollrühma, kui kasutatakse vehiiklit (kontsentratsioon peab vastama vehiikli kontsentratsioonile suurima annuse grupis). Kontrollrühma loomi tuleks kohelda sarnaselt katserühma loomadega (v.a uuritava ravimi manustamine). Suurima annuse korral peaks ilmnema toksiline toime, kuid surmajuhte ei tohiks olla või tekib neid vähe. Kui saadaval on andmed inimese ekspositsioonist, peaks madalaim annus ületama inimesel kasutatud taset. Kui kasutatakse enam kui ühte vahepealset annusetaset, peaks nende vahed olema sellised, et tekiks toksiliste toimete astmeline suurenemine. Väikesi ja keskmisi annuseid saavates rühmades ja kontrollrühmas peaks surmajuhte olema vähe, et tulemustest saaks teha tähenduslikke järeldusi.

Ekspositsiooni aeg

Igapäevane ekspositsioon peaks kestma kuus tundi pärast tasakaalukontsentratsiooni saabumist kambris. Teisi ekspositsiooni kestusi võib kasutada, kui seda nõuavad erivajadused.

Varustus

Katseloomad peavad olema inhalatsiooniruumides, mis on kavandatud nii, et võimaldavad dünaamiliselt vähemalt 12 õhuvahetust tunnis, et kindlustada piisav hapnikusisaldus ja uuritava aine ühtlane jaotus. Kui kasutatakse kambreid, tuleks need kavandada nii, et võimalikult vältida loomade tunglemist ja maksimeerida nende ekspositsiooni uuritavale ainele. Üldise reegli kohaselt, selleks et tagada kambri atmosfääri stabiilsus, ei tohi katseloomade kogumaht ületada 5 % kambrimahust. Kasutada või oronasaalset, ainult pead haaravat või individuaalset kogukehakambrit kasutavat ekspositsiooni; esimesed kaks viisi minimiseerivad aine teisi teid pidi organismi sattumise.

Jälgimisaeg

Kõiki loomi tuleb iga päev jälgida ja kõik toksilisuse ilmingud registreerida, märkides üles nende algusaja, ulatuse ja kestuse. Registreerida tuleb samuti surmaaeg ja aeg, millal toksilisuse nähud ilmuvad või kaovad.

Protseduur

Loomi eksponeeritakse uuritavale ainele viis kuni seitse päeva nädalas 90 päeva jooksul. Satelliitrühmadesse kuuluvaid loomi hoitakse jälgimise eesmärgil ilma ravita järgmised 28 päeva, et tuvastada toksilise toime möödumist või püsimist. Uuringu ajal tuleks säilitada temperatuuri 22±3 °C. Ideaaljuhul peaks õhuniiskus olema vahemikus 30 kuni 70 %, kuid teatud juhtudel (näiteks aerosoolide uuringud), ei pruugi see olla rakendatav. Ekspositsiooni ajal ei anta loomadele süüa ega juua.

Kasutatakse dünaamilist inhalatsioonisüsteemi, et saavutada sobivad analüütilised kontsentratsioonid. Sobilike ekspositsioonikontsentratsioonide leidmiseks on soovitatav läbi viia prooviuuring. Õhuvoolu tuleb kohandada nii, et tingimused kogu ekspositsioonikambris oleksid homogeensed. Süsteem peaks kindlustama, et stabiilsed ekspositsiooni tingimused saavutatakse nii ruttu kui võimalik.

Jälgida ja mõõta on vaja järgmisi parameetreid:

a) õhuvoolu kiirus (pidevalt);

b) uuritava aine tegelik kontsentratsioon hingatavas piirkonnas. Katseaine sisaldus igapäevase ekspositsiooni ajal ei tohi erineda keskmisest väärtusest rohkem kui ±15 %. Siiski võib tolmude ja aerosoolide puhul osutuda võimatuks sellise kontrollitaseme saavutamine, sellisel juhul on aktsepteeritav laiem kõikumine. Uuringu kestel tuleb hoida päevast päeva aine kontsentratsioon võimalikult ühtlasena. Generaatorsüsteemi arendamisel tuleb viia läbi osakeste suuruse analüüsid, et selgitada aerosooli stabiilsust. Ekspositsiooniperioodil tuleb analüüse teha nii tihti kui vaja, et määrata partiklisuuruste jaotuvuse ühtlust.

c) temperatuur ja niiskus;

d) ekspositsiooni ajal ja järel teostada süstemaatilisi vaatlusi ja registreerida tulemused; iga looma kohta peetakse eraldi dokumentatsiooni. Kõiki loomi tuleb jälgida iga päev ja märkida ära toksilisuse sümptomid (sh nende algusaeg, ulatus ja kestus). Puuri juures tehtavad vaatlused peaksid hõlmama naha ja karvkatte, silmade ja limaskestade, aga ka hingamis-, vereringe- ning autonoomse ja tsentraalse närvisüsteemi muutusi, somatomotoorset aktiivsust ja käitumismustrit. Iga nädal tuleks mõõta toidu tarbimist ja loomi kaaluda. Loomade regulaarne jälgimine on vajalik tagamaks niipalju kui võimalik, et loomad ei langeks katsest välja sellistel põhjustel nagu kannibalism, kudede autolüüs või loomade vale paigutus. Katseperioodi lõpus lahatakse kõik mitte-satelliit ravirühma kuulunud loomad. Surnud loomad tuleb eemaldada ja lahata, kui nad leitakse.

Tavalisel juhul tehakse kõigil loomadel (kaasa arvatud kontrollgruppi kuuluvatel) järgmised uuringud:

a) oftalmoloogiline uuring tuleks teha oftalmoskoobi või sobiva samaväärse vahendi abil enne uuritava aine manustamist ja uuringu lõppedes kõigile loomadele, kuid kindlasti suuri annuseid saanud ja kontrollrühma kuulunud loomadele. Kui leitakse muutusi silmades, tuleks uurida kõiki loomi;

b) katse lõpus tuleks uurida hematoloogilisi näitajaid, sealhulgas hematokrit, hemoglobiini kontsentratsioon, erütrotsüütide arv, leukotsüütide absoluutarv ja valem ning vere hüübimisnäitajaid, nagu näiteks hüübimisaeg, protrombiini aeg, tromboplastiini aeg või trombotsüütide arv;

c) kliinilise biokeemia näitajaid tuleb määrata uuringu lõpus. Kõikide uuringute puhul sobivate analüüside hulka kuuluvad elektrolüütide tasakaalu, süsivesikute metabolismi, maksa- ja neerufunktsiooni kajastavad näitajad. Spetsiifiliste testide valik sõltub vaatlusandmetest uuritava aine toimeviisi kohta. Soovitatavad analüüsid on: kaltsium, fosfor, kloriid, naatrium, kaalium, tühja kõhu glükoos (liigile kohase näljaperioodiga), seerumi glutamaatpüruvaadi transaminaas, ([1]) seerumi glutamaatoksaloatsetaadi transaminaas, ([2]) ornitiini dekarboksülaas, gammaglutamüül-transpeptidaas, uurea lämmastik, albumiin, seerumi kreatiniin, üldbilirubiin ja seerumi üldvalk. Toksilisuse adekvaatseks hindamiseks võib olla vajalik määrata järgmisi näitajaid: lipiidid, hormoonid, happe-aluse tasakaal, methemoglobiin ja koliinesteraasi aktiivsus. Kui ilmnenud toimeid on vaja põhjalikumalt uurida, võib kasutada veel teisigi kliinilise biokeemia analüüse;

d) uriinianalüüsi ei ole vaja teha rutiinselt, vaid ainult juhul, kui see on näidustatud oodatava või ilmnenud toksilisuse tõttu.

Kui teadaolevad lähteandmed ei ole piisavad, tuleks kaaluda hematoloogiliste ja kliinilise biokeemia näitajate määramist enne annustamise algust.

Lahang

Kõikidele loomadele tuleb teostada lahang. See hõlmab keha välispinna ja kõigi kehaavauste uurimist, samuti kolju, rindkere ja kõhuõõne ja nende sisu uurimist. Maks, neerud, neerupealised ja testised tuleb kaaluda nii kiiresti kui võimalik, et vältida kuivamist. Kõik järgmised organid või koed tuleb säilitada vastavates keskkonnatingimustes võimalikeks hilisemateks histopatoloogilisteks uuringuteks: kõik suured lesioonid, kopsud – tuleb eemaldada tervelt, kaaluda ja töödelda sobiva fiksaatoriga, et kindlustada kopsustruktuuri säilimine (perfusiooni fiksaatoriga peetakse efektiivseks protseduuriks), ninaneelu kude, ajukude – sealhulgas piklikaju/ajusild, väikeaju ja suuraju korteksi lõigud, ajuripats, kilpnääre/kõrvalkilpnääre, kõik harknäärme koed, hingetoru ja kopsud, süda, aort, (süljenäärmed), maks, põrn, neerud, neerupealised, pankreas, gonaadid, emakas (lisasugunäärmed), (nahk), sapipõis (kui see on olemas), söögitoru, magu, kaksteistsõrmiksool, tühi- ja niudesool, umbsool, jämesool, pärak, põis, näidis-lümfisõlmed, (emasloomal piimanäärmed), (reiepiirkonna lihased), perifeerne närv, rinnak koos luuüdiga, (silmad), (reieluu, sealhulgas liigespind), (seljaaju kolmel tasemel – kaelaosa, keskmine rinnaosa, lumbaarosa) ja (ekstraorbitaalsed pisaranäärmed). Kudesid, mida on mainitud sulgudes, on vaja uurida ainult juhul, kui see on näidustatud toksilisuse ilmingute tõttu või sihtorgani haaratuse tõttu.

Histopatoloogiline uuring

a) Täielik histopatoloogiline uuring tuleb teha kontrollrühma või suuri annuseid saanud rühma kuulunud loomade hingamiselundkonnast ja teistest organitest.

b) Uurida tuleb kõiki suuri lesioone.

c) Teiste annustega rühmades tuleb uurida sihtorganeid.

d) Väikese ja keskmise annuse rühmadesse kuuluvatel loomadel tuleks teostada kopsude histopatoloogilised uuringud infektsioonitunnuste suhtes, sest sel viisil on mugav hinnata loomade tervislikku seisundit. Edasisi histopatoloogilisi uuringuid ei pruugi nendesse rühmadesse kuuluvatel loomadel rutiinselt vaja olla, kuid need tuleb igal juhul teostada organitel, kus suurte annuste kasutamisel täheldati lesioonide teket.

e) Kui kasutatakse satelliitrühma, tuleks histopatoloogilised uuringud teha nendel organitel, mis ravi saanutel kahjustusid.

([1]) Praegu tuntud kui aspartaadi aminotransferaas.
([2]) Praegu tuntud kui alaniini aminotransferaas.

2. **ANDMED**

Andmed tuleks võtta kokku tabelivormis, näidates iga katsegrupi puhul ära loomade arvu uuringu alguses, nende loomade arvu, kellel ilmnes lesioone ja lesioonide tüübid ja iga tüübi protsentuaalse osakaalu. Tulemusi tuleb hinnata sobiva statistilise meetodi abil. Kasutada võib ükskõik millist tunnustatud statistilist meetodit.

3. **ARUANNE**

3.1. **Uuringu raport**

Uuringu raport peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

— loomaliik, liin, päritolu, keskkonnatingimused, dieet,

— katsetingimused:

Uuringuaparatuuri kirjeldus: sealhulgas kavand, tüüp, mõõtmed, õhuallikas, partiklite ja aerosooli tekitamise süsteem, õhu konditsioneerimise meetod, väljuva õhu töötlemine ja loomade kambritesse paigutamise metoodika, kui seda kasutatakse. Kirjeldada tuleb metoodikat, mida kasutatakse temperatuuri, niiskuse ja aerosooli partiklite suuruse või kontsentratsiooni stabiilsuse määramiseks, kui seda kasutatakse.

Ekspositsiooni andmed: need tuleks tuua tabelites ja esitada keskmiste väärtustena ja variaabluse näitajatega (nt standarddeviatsioon). Andmete hulgas tuleb registreerida:

a) õhuvoolu kiirused inhalatsiooniseadeldises;

b) õhu temperatuuri ja niiskuse;

c) kontsentratsioonid nominaalväärtustes (katseaine kogumaht, mis sisestatakse inhalatsiooniseadeldisse, jagatud õhu mahuga);

d) vehiikli olemus, kui seda kasutatakse;

e) tegelikud kontsentratsioonid katseajal loomade hingamise tsoonides;

f) keskmine osakeste suurus (vajadusel),

— toksilise mõju andmed soo ja annuste kaupa,

— toime puudumise tase, kui see on võimalik,

— surmaaeg uuringu ajal või kas loomad elasid kuni uuringu lõpetamiseni,

— toksiliste või muude toimete kirjeldus,

— iga normist kõrvalekalduva sümptomi ilmnemise aeg ja edasine kulg,

— andmed toidu ja kehakaalu kohta,

— oftalmoloogilised leiud,

— kasutatud hematoloogilised analüüsid ja kõik tulemused,

— kasutatud kliinilise biokeemia analüüsid ja kõik tulemused (sealhulgas kõik uriinianalüüside tulemused),

— lahanguleiud,

— histopatoloogiliste leidude detailne kirjeldus,

— tulemuste statistiline analüüs, kui see on võimalik,

— tulemuste arutelu,

— tulemuste interpretatsioon.

3.2. **Hinnang ja interpretatsioon**

Vt üldtutvustus B osa.

4. **VIITED**

Vt üldtutvustus B osa.

TERATOGEENSUSE UURING NÄRILISTEL JA MITTENÄRILISTEL

1. **MEETOD**

1.1. **Sissejuhatus**

Vt üldtutvustus B osa.

1.2. **Definitsioonid**

Vt üldtutvustus B osa.

1.3. **Võrdlusained**

Puuduvad.

1.4. **Uuringumeetodi põhimõte**

Uuritavat ainet manustatakse gradueeritud annustes või kontsentratsioonides mitmele tiinete katseloomade rühmale vähemalt selle tiinusperioodi vältel, mil leiab aset organogenees. Ühes grupis kasutatakse ühte annust. Vahetult enne oodatavat poegimispäeva emasloom hukatakse, eemaldatakse emakas ja uuritakse selle sisu. See uurimismeetod sobib embrüo- ja fetotoksilisuse hindamiseks.

1.5. **Kvaliteedikriteeriumid**

Puuduvad.

1.6. **Uuringumeetodi kirjeldus**

Ettevalmistused

Varem paaritamata, sarnase suuruse ja vanusega terved noored täiskasvanud emasloomad aklimatiseeritakse labortingimustega vähemalt viiepäevase perioodi vältel enne uuringu algust, seejärel nad paaritatakse tõestatud viljakusega isastega. Seemendatud emasloomad jagatakse juhuslikkuse alusel katserühmadesse.

Paaritus võib olla loomulik või kunstliku seemendamise teel. Uuritavat ainet manustatakse emasloomadele iga päev, alustades kohe pärast implantatsiooni ja manustamist jätkatakse kuni organogeneesi perioodi lõpuni. Päev enne oodatavat poegimist teostatakse hüsterektoomia ning looteid uuritakse siseelundite ja skeleti patoloogiate suhtes, sealhulgas kasvupeetus, hilinenud luustumine ja seedetrakti verejooksud.

Katsetingimused

Katseloomad

Tavaliselt kasutatavateks liikideks on rott, hiir, hamster ja küülik. Eelistatud liikideks on rott ja küülik. Kasutada tuleks tavaliselt kasutatavaid laborliine. Liinid ei tohiks olla madala viljakusega ja peaks demonstreerima iseloomulikku vastust teratogeenidele. Loomad peaksid olema puurides ühekaupa.

Arv ja sugu

Igal annusetasemel tuleb kasutada vähemalt 20 tiinet rotti, hiirt või hamstrit või vähemalt 12 tiinet küülikut. Eesmärgiks on kindlustada küllaldane pesakondade ja poegade arv, et võimaldada aine teratogeensuse hindamist.

Annused

Tuleks kasutada vähemalt kolme erinevat annust ja kontrollrühma. Kui uuritavat ainet manustatakse koos vehiikliga, tuleks kasutada ka vehiikli kontrollrühma. Vehiikli kasutamisel peavad selle toksikoloogilised omadused olema tead ning see ei tohiks olla teratogeenne ega mõjutada paljunemist. Kontrollrühma(de) loomi tuleks kohelda täpselt sama moodi, kui katserühmade loomi, v.a uuritava aine manustamine. Kui uuritava aine

füüsikalised, keemilised või bioloogilised omadused seda ei piira, peaks kõrgeim annus ideaalsel juhul põhjustama emasloomal ka teatud ulatuses süsteemse toksilisuse nähte, nagu näiteks kerge kehakaalu langus, kuid ei tohiks põhjustada rohkem kui 10 % emasloomade surma. Madalaim annus ei tohiks katseloomal esile kutsuda ainespetsiifiliste muutuste ilmnemist. Vahepealsed annused tuleks kõrgeima ja madalaima annuse vahel jaotada geomeetriliselt.

Piirtest

Madala toksilisusega ainete puhul ei pruugi uuringud teiste annustega osutuda vajalikuks, kui vähemalt 1 000 mg/kg annuse juures ei ilmne mingeid embrüotoksilisuse või teratogeensuse nähte.

Manustamise kestus

Uuringu 0-päevaks loetakse päeva, mil (kui võimalik) täheldatakse tupekorki ja/või spermat. Manustamisperiood peaks hõlmama enamuse organogeneesi perioodi. Selleks võib lugeda roti ja hiire puhul 6.–15. päeva, hamstril 6.–14. päeva või küüliku puhul 6.–18. päeva. Kui 0-päevaks loetakse päeva, mil toimus paaritus või kunstlik seemendamine, tuleks eelnevalt märgitud perioodidele lisada üks päev. Alternatiiviks on manustamisperioodi pikendamine kuni oodatava poegimise eelse päevani.

Jälgimisaeg

Üks kord päevas tuleks läbi viia põhjalik kliiniline läbivaatus. Lisaks tuleks loomi iga päev jälgida ja vajadusel võtta tarvitusele sobivad abinõud katseloomade väljalangemise minimeerimiseks.

Protseduur

Uuritavat ainet manustatakse suukaudselt sondi teel. Uuritavat ainet tuleks manustada iga päev umbes samal kellaajal.

Emastele katseloomadele manustatakse uuritavat ainet ettenähtud manustamisperioodi vältel iga päev. Annus võib põhineda emasloomade kehamassil aine manustamise alustamisel või teise võimalusena, võttes arvesse kehamassi kiiret suurenemist tiinuse jooksul, võib loomi perioodiliselt kaaluda ja arvestada annus vastavalt kõige viimasele kehamassi näidule. Toksilisuse ilmingud tuleks registreerida nende täheldamisel, märkides sealhulgas üles ilmnemise alguse, raskusastme ja kestuse. Emasloomad, kellel esinevad abordile või enneaegsele poegimisele viitavad sümptomid, tuleks hukata ja viia läbi nende hoolikas makroskoopiline uurimine. Manustamisperioodi järgne jälgimisaeg peaks kestma kuni umbes ühe päevani enne poegimist; eesmärgiks on hõlmata võimalikult suures ulatuses kogu tiinusperiood, kuid hoiduda katsetulemuste tõlgendamise raskustest, mis võivad esineda loomuliku poegimise korral. Puuri kõrval tehtud tähelepanekud peaksid muu hulgas sisaldama naha, karvastiku, silmade ja limaskestade muutusi, samuti hingamisteede, vereringe, autonoomse ja kesknärvisüsteemi muutusi, somatomotoorse tegevuse ja käitumismustri jälgimist. Tarbitud söödakogust tuleks mõõta kord nädalas. Loomi tuleks kaaluda üks kord nädalas.

Lahang

Uuringu jooksul või selle lõpus surnud/hukatud loomi tuleks uurida makroskoopiliselt, et tuvastada kõrvalekaldeid kehaehituses või patoloogilisi muutusi, mis oleksid võinud tiinust mõjutada. Kohe surmajärgselt tuleks eemaldada emakas ja uurida selle sisu, et teha kindlaks embrüode või loodete hukkumine ja elusate loodete arv. Emakasisese surma korral on tavaliselt võimalik selle tekkeaega kindlaks määrata. Rottide ja küülikute puhul on võimalik teha kindlaks kollakehade arv. Loodete puhul tuleks määrata nende sugu ja kaaluda neid eraldi ning arvutada kehamasside põhjal loote keskmine kehamass. Eemaldamise järgselt tuleks iga loodet väliselt uurida. Rottide, hiirte ja hamstrite puhul tuleks üks kolmandik kuni pool pesakonnast prepareerida ja uurida skeleti anomaaliate tuvastamiseks, ülejäänud osa pesakonnast tuleks prepareerida ja uurida sobivate meetodite abil pehmete kudede anomaaliate suhtes. Küülikute puhul tuleks iga loodet hoolika lahkamise käigus uurida siseorganite kõrvalekallete ja ka skeleti anomaaliate suhtes.

2. **ANDMED**

Andmed tuleks esitada tabeli vormis, näidates iga katserühma kohta loomade arvu uuringu alguses, tiinestunud loomade arvu, elusate loodete arvu ja suhtarvu ning skeleti või pehmete kudede anomaaliatega loodete arvu ja suhtarvu ning nende kuulumist pesakondade kaupa. Tulemuste hindamiseks tuleks kasutada sobivat statistilist meetodit. Kasutada võib kõiki tunnustatud statistilisi meetodeid.

3. **ARUANNE**

3.1. **Uuringu raport**

Uuringu raport peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

— loomaliik, liin, päritolu, keskkonnatingimused, söödaratsioon,
— katsetingimused,
— annused (sealhulgas vehiikel, kui seda kasutatakse) ja kontsentratsioonid,
— toksilise vastusreaktsiooni andmed annuste järgi,
— toimeta kontsentratsioone (kus võimalik),
— surmaaeg uuringu ajal või kas loomad elasid kuni uuringu lõpetamiseni,
— toksiliste või muude toimete kirjeldus,
— iga normist kõrvalekalduva sümptomi ilmnemise aeg ja edasine kulg,
— sööda ja kehamassi andmed,
— tiinuse kestus ja andmed pesakondade kohta (sealhulgas anamneesiandmed),
— looteandmed (elus/surnud, sugu, pehmete kudede ja skeleti defektid),
— pesakondade andmed (elus/surnud, sugu, pehmete kudede ja skeleti defektid iga peaskonna kohta),
— tulemuste statistiline analüüs
— tulemuste arutelu,
— tulemuste interpretatsioon.

3.2. **Hinnang ja interpretatsioon**

Vt üldtutvustus B osa.

4. **VIITED**

Vt üldtutvustus B osa.

KROONILISE TOKSILISUSE UURING

1. **MEETOD**

1.1. **Sissejuhatus**

Vt üldtutvustus B osa.

1.2. **Definitsioonid**

Vt üldtutvustus B osa.

1.3. **Võrdlusained**

Puuduvad.

1.4. **Uuringumeetodi põhimõte**

Uuritavat ainet antakse tavaliselt seitse päeva nädalas sobival manustamisviisil mitmele katseloomade rühmale. Igale rühmale ordineeritakse kindel uuritava aine annus ja seda manustatakse suurem osa nende loomade elueast. Aine manustamise ajal ja järgselt jälgitakse katseloomi iga päev, et sedastada toksiliste mõjude tunnuseid.

1.5. **Kvaliteedikriteeriumid**

Puuduvad.

1.6. **Uuringumeetodi kirjeldus**

Ettevalmistused

Loomi hoitakse eksperimentaalsetes elamis- ja toitumistingimustes vähemalt 5 päeva enne uuringut. Enne uuringu algust terved noored loomad randomiseeritakse ja määratakse uuritavat ainet saavatesse ning kontrollrühmadesse.

Katsetingimused

Katseloomad

Eelistatud liigiks on rott. Võttes arvesse eelnevalt läbiviidud uuringute tulemusi, võib kasutada eelmistest katsetest erinevaid loomaliike (närilisi või mitte-närilisi). Kasutada tuleb tavapäraste laboriloomade liinide noori terveid isendeid ja uuritava aine manustamine peaks algama võimalikult vara peale võõrutamist.

Uuringu alguses ei tohi katseloomade kaal erineda keskmisest kaalust enam kui ±20 %. Kui pikaajalisele uuringule eelneb subkroonilise suukaudse manustamise test, tuleb mõlemal juhul kasutada sama loomaliiki/-tõugu ja -liini.

Arv ja sugu

Näriliste korral peab igas eri annust saavas rühmas ja samuti kontrollrühmas olema vähemalt 40 isendit (20 emast ja 20 isast). Emasloomad ei tohi olla poeginud ega tiined. Kui plaanitakse vahepealset loomade surmamist, tuleb isendite arvu suurendada vastavalt selle arvu võrra, kui palju loomi kavatsetakse surmata enne uuringu täielikku lõpetamist.

Mittenäriliste puhul on aktsepteeritavad väiksemad rühmas, kuid mitte alla 4 isendi kummastki soost ühes grupis.

Annused ja ekspositsiooni sagedus

Lisaks kontrollgrupile peab kasutama vähemalt kolme erinevat annust saavat rühma. Kõige suurem annus peab esile kutsuma selgeid toksilisuse ilminguid, põhjustamata sealjuures liigselt surmajuhte. Madalaim annus ei tohi tekitada vähimalgi määral toksilisi mõjusid.

Vahepealne annus või annused tuleb valida suure ja väikse annuse väärtuste vahemiku keskelt.

Annuste valimisel tuleb arvesse võtta eelmiste toksilisuse katsete ja uuringute andmeid.

Ekspositsioon uuritavale ainele peaks normaalselt toimuma iga päev. Kui kemikaali manustatakse joogiveega või toidu hulka segatult, peavad need olema pidevalt kättesaadavad.

Kontrollrühm

Kasutada tuleb kontrollrühma, mis on igas suhtes identne katserühmaga, erinevus on vaid kokkupuutes katseainega.

Teatud tingimustel, näiteks inhalatsiooniuuringute korral, mille puhul kasutatakse aerosoole, või suukaudse manustamise uuringute puhul, kui kasutatakse iseloomustamata bioloogilise aktiivsusega emulgaatorit, peab kasutama lisaks negatiivset kontrollrühma. Negatiivsesse kontrollrühma kuuluvaid loomi koheldakse sarnaselt katserühma loomadega väljaarvatud asjaolu, et loomad ei puutu kokku uuritava ainega ega vehiikliga.

Manustamisviis

Kolm peamist manustamisviisi on suukaudne, nahakaudne ja inhalatsioon. Valik sõltub katseaine füüsikalistest ja keemilistest omadustest ning aine võimalikust manustamisviisist inimestel.

Nahakaudse manustamistee rakendamine hõlmab olulisi praktilisi probleeme. Nahakaudse imendumise tagajärjel tekkinud kroonilise süsteemse toksilisuse saab normaalsel juhul tuletada/üle kanda teiste suukaudsete uuringute tulemustest ja varasematest nahakaudse toksilisuse testide põhjal saadud nahakaudse imendumise ulatuse andmetest.

Suukaudse manustamise uuringud

Kui uuritav aine imendub mao-sooletraktist ja kui allaneelamine on üks võimalikest inimese ekspositsiooni viisidest, eelistatakse vastunäidustuste puudumisel suukaudset manustamist.

Loomad võivad saada uuritavat ainet toiduga, lahustatuna joogivees või kapsliga.

Ideaaltingimustes annustatakse uuritavat ainet iga päev seitse korda nädalas, sest viiepäevane manustamine võib lubada looma paranemist või toksiliste nähtude taandumist perioodil, kui uuritavat ainet ei manustata. See võib mõjutada tulemusi koos järgneva hinnanguga. Siiski, peamiselt praktilistel kaalutlustel peetakse ka viis päeva nädalas manustamist vastuvõetavaks.

Inhalatsiooniuuringud

Et inhalatsiooniuuringud kätkevad endas teiste manustamisviisidega võrreldes mitmeid keerukaid tehnilisi probleeme, on siin toodud detailsemad juhtnöörid selle meetodi kohta. Peab ka märkima, et intratrahheaalne tilgutamine võib olla üks arvestatavaid alternatiivseid meetodeid, et teatud olukordades ainet manustada.

Pikemaajaline ekspositsioon on tavaliselt kavandatud, et jäljendada ekspositsiooni inimesel. Loomade ekspositsioon uuritavale ainega korraldatakse kas kuus tundi päevas viiel päeval nädalas pärast kambri kontsentratsioonide tasakaalustamist (seda nimetatakse vahelduvaks kokkupuuteks) või kasutatakse sarnaselt pidevale keskkonnamõjurile kokkupuute aega 22 kuni 24 tundi seitsmel päeval nädalas (katkematu kokkupuude). Viimasel juhul jääb üks tund päevas loomade söötmiseks, mis peaks toimuma samadel kellaaegadel, ja kambrite korrashoiuks. Mõlema skeemi korral eksponeeritakse loomi ettenähtud ainele kindlatel kontsentratsioonidel.

Suurim erinevus vahelduva ja katkematu inhalatsiooniuuringu vahel on see, et esimesel jääb 17- või 18tunnine periood, mil loomad võivad taastuda kokkupuute mõjust ja nädalavahetuseti on taastumisperiood veelgi pikem. Vahelduva või katkematu ekspositsiooni valik sõltub uuringu eesmärkidest ning inimesel kasutatavast manustamisviisist, mida tahetakse jäljendada. Siiski tuleb arvestada teatud tehnilisi raskusi. Näiteks katkematu kokkupuute eelised keskkonna tingimuste jäljendamiseks võivad saada vastulöögi tehniliste raskuste tõttu, sealhulgas söötmise ja jootmise vajadus ekspositsiooni ajal ning keerukamate (ja usaldusväärsemate) aerosooli- ja aurugeneraatorite ning jälgimistehnika vajadus.

Ekspositsioonikambrid

Katseloomad peavad olema inhalatsioonikambrites, mis on kavandatud nii, et võimaldavad dünaamilist õhuvoolu vähemalt 12 õhuvahetust tunnis, selleks et kindlustada piisava hapniku ja ühtlaselt jaotunud katseaine sisalduse. Kontrollrühmale ja katserühmale mõeldud kambrid peavad olema ehituslikult ja disainilt samasugused, et tagada kõikides aspektides võrreldavad mõjustustingimused, välja arvatud katseainega kokkupuutumise faktoris. Kambris hoitakse vähene negatiivne rõhk, mis takistab katseaine väljaimbumist ümbritsevasse õhku. Katseloomade tunglemine kambrites peaks olema viidud miinimumini. Üldise reegli kohaselt, selleks et tagada kambri õhkkonna stabiilsus, ei tohi katseloomade kogumaht ületada 5 % kambrimahust.

Kambrites tuleb teostada järgnevaid mõõtmisi või kontrolle:

i) õhuvool: eelistatult tuleb õhuvoolu kiirust kambrites jälgida pidevalt;

ii) kontsentratsioon: igapäevase ekspositsiooni ajal ei tohi uuritava aine kontsentratsioon erineda keskmisest väärtusest rohkem kui ±15 %;

iii) temperatuur ja niiskus: näriliste jaoks tuleb temperatuur hoida 22±2 °C ja niiskus kambrites peab olema 30 kuni 70 %, välja arvatud juhul, kui eksponeeritava aine viimiseks kambri atmosfääri kasutatakse vett. Soovitatavalt peaks mõlemat faktorit jälgima pidevalt;

iv) osakeste suuruse mõõtmised: osakeste suuruse jaotumust tuleb kambrite atmosfääris määrata nii vedelates kui tahketes aerosoolides. Aerosoolpartiklid peavad olema katseloomadele sissehingamiseks sobiva suurusega. Kambri õhu analüüsid peavad olema võetud aladelt, kus loomad hingavad. Õhu analüüsid peavad iseloomustama nende osakeste jaotumust, millele katseloomi eksponeeritakse, ja neid tuleb aerosoolheljumites gravimeetriliselt analüüsida, isegi kui suur osa aerosoolist ei ole võimalik sisse hingata. Generaatorsüsteemi väljatöötamisel tuleb sagedasti teha osakeste suuruse analüüse, et selgitada aerosooli stabiilsust. Edaspidi tuleb analüüse teha nii tihti kui vaja, et määrata adekvaatselt loomadele kokkupuuteks vajaliku aine partiklite jaotuvuse ühtlust.

Uuringu kestus

Manustamisperioodi kestus peaks olema vähemalt 12 kuud.

Protseduur

Vaatlused

Hoolikas kliiniline uurimine tuleb teostada vähemalt üks kord päevas. Igapäevased lisavaatlused koos asjakohase sekkumisega on vajalikud, et minimiseerida loomade uuringust väljalangemist, näiteks tuleb surnud loomad lahata või külmutada, nõrgad või suremas loomad surmata või isoleerida. Hoolikaid vaatlusi tuleb teha toksiliste nähtude ilmnemise ja progresseerumise kindlakstegemiseks, aga ka haiguse, autolüüsi või kannibalismi tõttu tekkivate kadude vältimiseks.

Kõikide loomade kliinilised andmed tuleb registreerida, sealhulgas neuroloogilised ja silmas toimuvad muutused, aga ka suremus. Toksilise seisundi tekke ja progresseerumise aeg, samuti kasvajakahtlus tuleb registreerida.

Iga looma kehakaal tuleb registreerida eraldi korra nädalas katseperioodi esimesel kolmeteistkümnel nädalal ja seejärel vähemalt korra nelja nädala jooksul. Toidu tarbimist hinnatakse igal nädalal uuringu esimesel kolmeteistkümnel nädalal ja seejärel ligikaudu 3kuuliste intervallidega, kui loomade tervislik seisund või kehakaalu muutused ei nõua teisiti.

Hematoloogiline uuring

Hematoloogiline uuring (näiteks hemoglobiini sisaldus, leukotsüütide absoluutarv, trombotsüütide arv või teised vere hüübimisvõimet peegeldavad näitajad) tuleks teostada kolme kuu järel, kuue kuu järel ja seejärel umbes kuuekuuliste intervallidega ning uuringu lõpetamisel kõikidel loomadel mittenäriliste liikide puhul ja rottide puhul kümnel loomal kummaski soost igas rühmas. Kui võimalik, tuleks kõikidel ajamomentidel võtta analüüsid samadelt rottidelt. Lisaks tuleks mittenärilistel võtta ka uuringueelne vereanalüüs.

Kui kliiniliste vaatluste käigus ilmneb loomade tervisliku seisundi halvenemine, tuleks nendel loomadel teha vereanalüüs rakkude valemi loendamisega.

Verevalem loendatakse suure annuse rühma ja kontrollrühma kuuluvate loomade vereanalüüsist. Järgmises madalama annusega grupis tuleb valem loendada ainult juhtudel, kui suure annuse rühma ja kontrollrühma vahel ilmnes oluline lahknemine või kui see on näidustatud patoloogiliste leidude tõttu.

Uriinianalüüs

Uriinianalüüsid võetakse mittenäriliste puhul kõikidelt loomadelt ja rottide puhul iga rühma kohta kümnelt loomalt kummaski soost. Võimaluse korral tuleks analüüsid koguda samadelt rottidelt samade intervallidega nagu hematoloogiliseks uuringuks. Järgmised näitajad määratakse kas kõikidel loomadel eraldi või kokkusegatud proovist/soo/uuringurühma kohta:

— välimus: maht ja tihedus igal loomal eraldi,

— valk, glükoos, ketoonid, peiteveri (poolkvantitatiivselt),

— sademe mikroskoopia (poolkvantitatiivselt).

Kliiniline keemia

Vereanalüüse kliinilise keemia uuringuteks võetakse umbes kuuekuulise intervalliga ja uuringu lõpetamisel kõikidelt loomadelt mittenäriliste liikide puhul ja kümnelt rotilt kummastki soost kõikides rühmades; võimaluse korral tuleks igal ajahetkel võtta analüüs samadelt loomadelt. Lisaks kogutakse mittenäriliste liikidel uuringu eelsed analüüsid. Proovidest eraldatakse plasma ja tehakse järgmised määramised:

— valgu kontsentratsioon,

— albumiini kontsentratsioon,

— maksafunktsiooni näitajad (nagu alkaalse fosfataasi aktiivsus, glutamaadi püruvaattransaminaasi ([1]) aktiivsus, glutamaadi oksaloatsetaattransaminaasi ([2]) aktiivsus), gammaglutamüüli transpeptidaas, ornitiini dekarboksülaas,

— süsivesikute metabolism, nagu näiteks tühja kõhu glükoos,

— neerufunktsiooni näitajad, nagu vere uurea lämmastik.

Lahang

Lahang teostatakse kõikidele loomadele, kaasa arvatud nendele, kes surid katseajal või surmati, kuna leiti suremas. Enne surmamist tuleb vererakkude valemi loendamiseks koguda vereproovid kõikidelt loomadelt. Säilitada tuleb kõik makroskoopiliselt nähtavad lesioonid, kasvajad või kasvaja kahtlased lesioonid. Tuleks püüda leida korrelatsiooni makroskoopiliste mikroskoopiliste leidude vahel.

Kõik järgmised organid või koed tuleb säilitada vastavates keskkonnatingimustes võimalikeks hilisemateks histopatoloogilisteks uuringuteks: ajukude ([3]) (piklikaju/ajusild, väikeaju ja suuraju korteks), ajuripats, kilpnääre (sealhulgas kõrvalkilpnääre), harknääre, kopsud (koos trahheaga), süda, aort, süljenäärmed, maks, ([3]) põrn, neerud, ([3]) neerupealised, ([3]) söögitoru, magu, kaksteistsõrmiksool, tühi- ja niudesool, umbsool, jämesool, pärasool, emakas, kusepõis, lümfisõlmed, kõhunääre, suguorganid, ([3]) lisasugunäärmed, nahk, emasloomadel piimanäärmed, lihaskond, perifeerne närv, selja-aju kolmel tasandil (kaelaosa, keskmine rinnaosa ja nimmeosa), rinnak koos luuüdiga, reieluu koos liigesega ja silmad. Kopsude ja kusepõie parimaks säilitamiseks tuleb nad puhuda fikseerivat ainet täis; täispuhutud kopsud on inhalatsioonikatsete korral olulise tähtsusega õigeks histopatoloogiliseks analüüsiks. Inhalatsiooniuuringute korral peab säilitama kogu hingamiselundkonna, sealhulgas ninaõõne, neelu ja kõri.

Kui teostatakse teisi kliinilisi uuringud, peaks neist saadav informatsioon olema kättesaadav enne mikroskoopilisi uuringuid, sest need võivad anda patoloogile väärtuslikke juhtnööre.

Histopatoloogiline uuring

Kõiki silmaga nähtavaid muutusi, eriti kasvajaid ja muid lesioone, mis leitakse ükskõik millisest organist, tuleks uurida mikroskoopiliselt. Lisaks on soovitatav teostada järgmised uuringud:

a) Kõigi säilitatud organite ja kudede mikroskoopiline uuring koos leitud lesioonide täieliku kirjeldusega:

   1. kõigil loomadel, kes surid või surmati uuringu kestel;

   2. kõigil suure annuse rühma ja kontrollrühma loomadel;

b) organeid ja kudesid, milles ilmneb muutusi, mis on põhjustatud või mis võivad olla põhjustatud uuritava aine mõjust, tuleb uurida ka väikesi annuseid saanud rühmades;

c) kui uuringu tulemustes ilmneb loomade normaalse elukestuse oluline vähenemine või tekivad mõjustused, mis võivad muuta toksilist vastust, tuleks eelkirjeldatud viisil uurida järgmise väiksema annuse rühma kuuluvaid loomi;

d) informatsioon vastaval loomaliinil normaalselt tekkivate lesioonide sageduse kohta sarnastel laboritingimustel, st ajaloolised kontrollandmed, on asendamatud ravitud loomadel leitud muutuste olulisuse korrektseks hindamiseks.

([1]) Praegu tuntud kui aspartaadi aminotransferaas.
([2]) Praegu tuntud kui alaniini aminotransferaas.
([3]) Need organid (pluss kilpnääre koos kõrvalkilpnäärmetega) tuleb kaaluda kümnel loomal kummastki soost iga rühma kohta näriliste puhul ja kõigil loomadel mittenäriliste puhul.

2. **ANDMED**

Andmed tuleb esitada kokkuvõtliku tabelina, näidates iga katsegrupi puhul loomade arvu katse alguses; isendite arvu, kellel ilmneb katseaja jooksul lesioone ja iga lesiooni protsentuaalne esinemissagedus loomadel. Tulemusi tuleb hinnata sobiva statistilise meetodiga. Kasutada võib iga tunnustatud statistilist meetodit.

3. **ARUANNE**

3.1. **Uuringu raport**

Uuringu raport peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

— loomaliik, liin, päritolu, keskkonnatingimused, dieet,

— katsetingimused:

Ekspositsiooniseadeldise kirjeldus: Tuleb märkida seadeldise disain, tüüp, mõõtmed, õhu lähteallikas, osakesi ja aerosoole tootev süsteem, õhu konditsioneerimise meetod, heitõhu töötlemine, loomade majutamise korraldus testkambrites, kui neid kasutatakse. Kirjeldada tuleb temperatuuri ja niiskuse mõõtmise vahendeid ning vajadusel aerosooli kontsentratsiooni stabiilsust ja osaksete suurust.

Andmed ekspositsiooni kohta:

Andmed tuleb esitada tabelina ja esitada keskmiste väärtustena ja variaabluse näitajatega (nt standarddeviatsioon).

Andmete hulgas tuleb registreerida:

a) õhuvoolu kiirused inhalatsiooniseadeldises;

b) õhu temperatuur ja niiskus;

c) kontsentratsioonid nominaalväärtustes (katseaine kogumaht, mis sisestatakse inhalatsiooniseadeldisse jagatud õhu mahuga);

d) vehiikli olemus, kui seda kasutatakse;

e) tegelikud kontsentratsioonid katseajal loomade hingamise tsoonides;

f) keskmine osakeste suurus (vajadusel),

— annused (sealhulgas vehiikli annused, kui seda kasutatakse) ja kontsentratsioonid,

— toime puudumise tase, kui see on võimalik,

— surmaaeg uuringu ajal või kas loomad elasid kuni uuringu lõpetamiseni,

— toksiliste või muude toimete kirjeldus,

— iga normist kõrvalekalduva sümptomi ilmnemise aeg ja edasine kulg,

— andmed toidu ja kehakaalu kohta,

— oftalmoloogilised leiud,

— kasutatud hematoloogilised analüüsid ja kõik tulemused,

— kasutatud kliinilise biokeemia analüüsid ja kõik tulemused (sealhulgas kõik uriinianalüüside tulemused),

— lahanguleiud,

— histopatoloogiliste leidude detailne kirjeldus,

— tulemuste statistiline analüüs, kui see on võimalik,

— tulemuste arutelu,

— tulemuste interpretatsioon.

3.2. **Hinnang ja tõlgendamine**

Vt üldtutvustus B osa.

4. **VIITED**

Vt üldtutvustus B osa.

KARTSINOGEENSUSE UURING

1. **MEETOD**

1.1. **Sissejuhatus**

Vt üldtutvustus B osa.

1.2. **Definitsioonid**

Vt üldtutvustus B osa.

1.3. **Võrdlusained**

Puuduvad.

1.4. **Uuringumeetodi põhimõte**

Uuritavat ainet antakse tavaliselt seitse päeva nädalas sobival manustamisviisil mitmele katseloomade rühmale. Igale rühmale ordineeritakse kindel uuritava aine annus ja seda manustatakse suurem osa nende loomade elueast. Aine manustamise ajal ja järgselt jälgitakse katseloomi iga päev, et sedastada toksiliste mõjude tunnuseid, eriti tuumorite arenemist.

1.5. **Kvaliteedikriteeriumid**

Puuduvad.

1.6. **Uuringumeetodi kirjeldus**

Loomi hoitakse eksperimentaalsetes elamis- ja toitumistingimustes vähemalt 5 päeva enne uuringut. Enne testi terved noored loomad randomiseeritakse ja määratakse uuritavat ainet saavatesse ning kontrollrühmadesse.

Katseloomad

Võttes arvesse eelnevalt läbiviidud uuringute tulemusi, võib kasutada eelmistest katsetest erinevaid loomaliike (närilisi või mitte-närilisi). Kasutada tuleb tavapäraseid laboriloomade liinide noori terveid isendeid ja uuritava aine manustamine peab algama võimalikult vara peale imetamisperioodi.

Uuringu alguses ei tohi katseloomade kaal erineda keskmisest kaalust enam kui ±20 %. Kui pikaajalisele uuringule eelneb subkroonilise suukaudse manustamise test, tuleb mõlemal juhul kasutada sama loomaliiki/-tõugu ja -liini.

Arv ja sugu

Näriliste korral peab igas eri annust saavas rühmas ja samuti kontrollrühmas olema vähemalt 100 isendit (50 emast ja 50 isast). Emasloomad ei tohi olla poeginud ega tiined. Kui plaanitakse vahepealset loomade surmamist, tuleb isendite arvu suurendada vastavalt selle arvu võrra, kui palju loomi kavatsetakse surmata enne uuringu täielikku lõpetamist.

Annused ja kokkupuute sagedus

Kaasnevale kontrollgrupile lisaks peab kasutama vähemalt kolme erinevat annust saavat rühma. Kõige kõrgem annus peab esile kutsuma minimaalseid toksilisi mõjusid, näiteks kehakaalu juurdekasvu vähene pidurdumine (vähem kui 10 %), ilma et normaalset elukestust mõjutaks teised toimed peale kasvajate.

Madalaim annus ei tohi häirida looma normaalset kasvu, arengut ja pikaealisust või tekitada vähimalgi määral toksilisi mõjusid. Tavaliselt ei tohi madalaim annus olla vähem kui 10 % suurest doosist.

Vahepealne annus või annused tuleb valida suure ja väikse annuse väärtuste vahemiku keskelt.

Annuste valimisel tuleb arvesse võtta eelmiste toksilisuse katsete ja uuringute andmeid.

Ekspositsioon uuritavale ainele peaks reeglipäraselt toimuma iga päev. Kui kemikaali manustatakse joogiveega või toidu hulka segatult, peavad need olema pidevalt kättesaadavad.

Kontrollrühm

Kasutada tuleb kontrollrühma, mis on igas suhtes identne katserühmaga, erinevus on vaid kokkupuutes katseainega.

Teatud tingimustel, näiteks inhalatsiooniuuringute korral, mille puhul kasutatakse aerosoole, või suukaudse manustamise uuringute puhul, kui kasutatakse iseloomustamata bioloogilise aktiivsusega emulgaatorit, peab kasutama lisaks kontrollrühma, kus loomad ei puutu kokku ülekandeainega.

Manustamisviis

Kolm peamist manustamisviisi on suukaudne, nahakaudne ja inhalatsioon. Valik sõltub katseaine füüsikalistest ja keemilistest omadustest ning aine võimalikust manustamisviisist inimestel.

Suukaudse manustamise uuringud

Kui uuritav aine imendub mao-sooletraktist ja kui allaneelamine on üks võimalikest inimese ekspositsiooni viisidest, eelistatakse vastunäidustuste puudumisel suukaudset manustamist. Loomad võivad saada uuritavat ainet toiduga, lahustatuna joogivees või kapsliga.

Ideaaltingimustes annustatakse uuritavat ainet iga päev seitse korda nädalas, sest viie korra puhul võib loom paraneda või toksilised nähud taanduda perioodil, kui uuritavat ainet ei manustata. See võib mõjutada tulemusi koos järgneva hinnanguga. Siiski, peamiselt praktilistel kaalutlustel peetakse ka viis päeva nädalas manustamist vastuvõetavaks.

Nahakaudse manustamise uuringud

Nahakaudne manustamine, aine määrimine nahapinnale sobib juhul, kui soovitakse jäljendada selle aine peamist manustamisviisi inimesele ja koostatakse mudel järelduste tegemiseks nahakahjustuste kohta.

Inhalatsiooniuuringud

Et inhalatsiooniuuringud kätkevad endas teiste manustamisviisidega võrreldes mitmeid keerukamaid tehnilisi probleeme, antakse siin selle meetodi kohta detailsemaid juhtnööre. Peab märkima, et intratrahheaalne tilgutamine võib olla üks arvestatavaid alternatiivseid meetodeid, et teatud olukordades ainet manustada.

Pikemaajaline ekspositsioon on tavaliselt kavandatud nii, et see jäljendaks inimese ekspositsiooni. Loomade kokkupuude uuritava ainega korraldatakse kas kuus tundi päevas viiel päeval nädalas pärast kambri kontsentratsioonide tasakaalustamist (seda nimetatakse vahelduvaks kokkupuuteks) või kasutatakse sarnaselt pidevale keskkonnamõjurile kokkupuute aega 22 kuni 24 tundi seitsmel päeval nädalas (katkematu kokkupuude). Viimasel juhul jääb üks tund päevas loomade söötmiseks, mis peaks toimuma samadel kellaaegadel, ja kambrite korrashoiuks. Mõlema skeemi korral eksponeeritakse loomi ettenähtud ainele kindlatel kontsentratsioonidel.

Suurim erinevus vahelduva ja katkematu inhalatsiooniuuringu vahel on see, et esimesel jääb 17- või 18tunnine periood, mil loomad võivad taastuda kokkupuute mõjust ja nädalavahetuseti on taastumisperiood veelgi pikem.

Vahelduva või katkematu kokkupuute valik sõltub uuringu eesmärkidest ning inimesel rakendatavast manustamisviisist, mida tahetakse jäljendada. Siiski tuleb arvestada teatud tehnilisi raskusi. Näiteks katkematu kokkupuute eelised keskkonna tingimuste jäljendamiseks võivad saada vastulöögi tehniliste raskuste tõttu, sealhulgas söötmise ja jootmise vajadus ekspositsiooni ajal ning keerukamate (ja usaldusväärsemate) aerosool- ja aurugeneraatorite ning jälgimistehnika vajadus.

Ekspositsioonikambrid

Katseloomad peavad olema inhalatsioonikambrites, mis on kavandatud nii, et võimaldavad dünaamiliselt vähemalt 12 õhuvahetust tunnis, selleks et kindlustada piisava hapniku ja ühtlaselt jaotunud katseaine sisalduse. Kontrollgrupile ja katsegrupile mõeldud kambrid peavad olema ehituslikult ja disainilt samasugused, et tagada võrreldavad mõjustustingimused kõikides aspektides, välja arvatud katseainega kokkupuutumise faktoris. Kambris hoitakse vähene negatiivne rõhk, mis takistab katseaine väljaimbumist ümbritsevasse õhku. Katseloomade tunglemine kambrites peaks olema viidud miinimumini. Üldise reegli kohaselt, selleks et tagada kambri õhkkonna stabiilsus, ei tohi katseloomade kogumaht ületada 5 % kambrimahust.

Kambrites tuleb teostada järgnevaid mõõtmisi või kontrolle:

i) õhuvool: eelistatult tuleb õhuvoolu kiirust kambrites jälgida pidevalt;

ii) kontsentratsioon: igapäevase ekspositsiooni ajal ei tohi katseaine sisaldus erineda keskmisest väärtusest rohkem kui ±15 %. Uuringu kestel tuleb aine kontsentratsioon hoida päevade lõikes võimalikult ühtlasena;

iii) temperatuur ja niiskus: näriliste jaoks tuleb temperatuur hoida 22±2 °C ja niiskus peab olema kambrites 30 kuni 70 %, välja arvatud juhul, kui eksponeeritava aine viimiseks kambri atmosfääri kasutatakse vett. Soovitatavalt peaks mõlemat faktorit jälgima pidevalt;

iv) osakeste suuruse mõõtmised: osakeste suuruse jaotumus peab olema kambrite atmosfääris määratud nii vedelates kui tahketes aerosoolides. Aerosoolpartiklid peavad olema katseloomadele sissehingamiseks sobiva suurusega. Kambri õhu analüüsid peavad olema võetud aladelt, kus loomad hingavad. Õhu analüüsid peavad iseloomustama nende osakeste jaotumust, millele katseloomi eksponeeritakse, ja neid tuleb aerosoolheljumites gravimeetriliselt analüüsida, isegi kui suur osa aerosoolist ei ole võimalik sisse hingata. Generaatorsüsteemi väljatöötamisel tuleb sagedasti teha osakeste suuruse analüüse, et selgitada aerosooli stabiilsust. Edaspidi tuleb analüüse teha nii tihti kui vaja, et määrata adekvaatselt loomadele kokkupuuteks vajaliku aine partiklite jaotuvuse ühtlust.

Uuringu kestus

Kartsinogeensuse uuringu kestus hõlmab tavaliselt suurema osa katseloomade elueast. Uuring peaks lõppema hiirtel ja hamstritel 18 kuu järel ja rottidel 24 kuu järel. Siiski, teatud pikemaealistel ja/või kasvaja madala spontaanse tekkimise kiirusega liinidel peaks uuring lõppema hiirtel ja hamstritel 24. kuul ja rottidel 30. kuul. Teine võimalus on lõpetada selline laiaulatuslik uuring juhul, kui ellujäänute arv madalaimat annust saanud loomarühmas või kontrollrühmas ulatub 25 %. Kui katset lõpetades ilmneb elusolevatel isendite hulgas väljendunud sooline erinevus, peab iga sugu analüüsima eraldi. Kui loomad surevad enneaegselt selgelt sedastatavate toksiliste nähtude tõttu ainult kõrge annusega uuringugrupis ja need toksilised mõjud ei põhjusta probleeme teistes gruppides, ei pruugi seetõttu uuringut lõpetada. Negatiivne uurimustulemus on vastuvõetav, kui mitte üheski grupis ei kaotatud katseajal üle 10 % isenditest autolüüsi, kannibalismi või hooldamise probleemide tõttu ja ühegi grupi elulemus ei ole vähem kui 50 % 18. kuul hiirte ja hamstrite kasutamisel ning 24. kuul rottide korral.

Protseduur

Vaatlused

Igapäevased vaatlused kambrites peavad hõlmama naha- ja karvkatte, silmade ja limaskesta muutusi, lisaks tuleb hinnata hingamis-, vereringeelundkonda, autonoomset ja kesknärvisüsteemi, somatosensoorset aktiivsust ja käitumismudelit.

Loomade regulaarsed vaatlused on vajalikud selleks, et mitte kaotada isendeid uuringu ajal selliste põhjuste tõttu nagu kannibalism, kudede autolüüs või looma vale paigutuse. Surnud loomad tuleb koheselt eemaldada, surmata ja lahata.

Kõikide loomade kliinilised andmed ja suremus peavad olema registreeritud. Eriline tähelepanu tuleb pöörata kasvajate tekkimisele: iga nähtava või palpeeritava tuumori puhul tuleb märkida märkamisaeg, lokalisatsioon, mõõtmed, väline kuju ja levik.

Toidu tarbimist (ja joogi tarbimist, kui katseaine manustatakse joogivee kaudu) hinnatakse igal nädalal uuringu esimesel kolmeteistkümnel nädalal ja seejärel ligikaudu 3kuuliste intervallidega, kui loomade tervislik seisund või kehakaalu muutused ei nõua teisiti.

Iga looma kehakaal tuleb registreerida eraldi korra nädalas katseperioodi esimesel kolmeteistkümnel nädalal ja seejärel vähemalt korra nelja nädala jooksul.

Kliinilised analüüsid

Hematoloogia

Kui katseloomade kliinilised vaatlused kinnitavad loomade tervisliku seisundi muutust katseperioodil, tuleb nendel loomade määrata vereanalüüs koos verevalemiga.

Vere äigepreparaadid võetakse 12. ja 18. kuul ja enne lahangut. Vererakud loendatakse kõrge annuse saanud loomadel ja kontrollrühmal. Kui need andmed, eelkõige enne lahkamist võetud analüüsid, või patoloogilised andmed kinnitavad vajadust, loendatakse valem järgmisel madalama annusega rühmal või rühmadel.

Lahang

Lahang teostatakse kõikidele loomadele, kaasa arvatud nendele, kes surid katseajal või surmati, kuna leiti suremas. Säilitada tuleb kõik makroskoopiliselt nähtavad tuumorid või kahjustused või tuumori kahtlased lesioonid.

Kõik järgmised organid või koed tuleb säilitada vastavates keskkonnatingimustes võimalikeks hilisemateks histopatoloogilisteks uuringuteks: ajukude (sealhulgas piklikaju/ajusild, väikeaju ja suuraju korteksi lõigud), ajuripats, kilpnääre/kõrvalkilpnääre, kõik harknäärme koed, hingetoru ja kopsud, süda, aort, süljenäärmed, maks, põrn, neerud, neerupealised, kõhunääre, suguorganid, emakas, lisasugunäärmed, nahk, söögitoru, magu, kaksteistsõrmiksool, tühi- ja niudesool, umbsool, jämesool, pärasool, kusepõis, iseloomulik lümfisõlm, emasloomadel piimanäärmed, reie lihaskond, perifeerne närv, rinnak koos luuüdiga, reieluu koos liigesega, seljaaju kolmel tasandil (kaelaosa, keskmine rinnaosa ja nimmeosa) ja silmad.

Kopsude ja kusepõie parimaks säilitamiseks tuleb nad täis puhuda fikseeriva ainega; täispuhutud kopsud on inhalatsioonikatsete korral olulise tähtsusega õigeks histopatoloogiliseks analüüsiks. Inhalatsiooniuuringute korral peab säilitama kogu hingamiselundkonna, sealhulgas ninaõõne, neelu ja kõri.

Histopatoloogiline uuring

a) Täielik histopatoloogiline uuring tuleb viia läbi kõikide uuringuperioodil surnud või surmatud loomade organitel ja kudedel ja kõikidel kontrollrühma ja suurt annust saanud rühma kuulunud loomadel.

b) Kõik selgelt nähtavad kasvajad või kasvajakahtlased kahjustused tuleb kõikides rühmades kontrollida mikroskoopiliselt.

c) Neoplastiliste kahjustuste olulise erinevuse korral kõrge annusega rühmas ja kontrollrühmas tuleb teistes rühmades teostada vastava organi või koe histopatoloogiline uuring.

d) Kui suure annuse rühmas on elulemus märkimisväärselt madalam kui kontrollgrupil, tuleb täielik uuring teostada madalama annuse rühmast järgmise grupi isenditele.

e) Kui esineb tõendeid, et kõrge annusega rühma loomadel on toksilisi või teisi nähtusid, mis võivad mõjutada neoplastilist reaktsiooni, tuleb täielik uuring teostada madalama annusega rühmast järgmise rühma isenditele.

2. ANDMED

Andmed tuleb esitada kokkuvõtliku tabelina, näidates iga katsegrupi puhul loomade arvu katse alguses; isendite arvu, kellel ilmneb katseaja jooksul kasvajaid; kasvaja sedastamise aeg ja loomade arv, kellel peale surmamist leiti kasvajaid. Tulemused tuleb hinnata sobiva statistilise meetodiga. Kasutada võib iga tunnustatud statistilist meetodit.

3. ARUANNE

3.1. Uuringu raport

Uuringu raport peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

— loomaliik, liin, päritolu, keskkonnatingimused, dieet,

— katsetingimused:

Ekspositsiooniseadeldise kirjeldus:

Tuleb märkida seadeldise disain, mõõtmed, õhu lähteallikas, osakesi ja aerosoole tootev süsteem, õhupuhastamise meetod, heitõhu menetlemine, testkambrite kasutamisel tuleb märkida elamistingimuste loomise meetod. Kirjeldada tuleb temperatuuri ja niiskuse mõõtmise meetodit ning vajadusel aerosooli kontsentratsiooni stabiilsust ja osakeste suurust.

Andmed katseainega kokkupuutumise kohta:

Andmed tuleb esitada tabelina ja märkida aritmeetilised keskmised koos statistilise rea andmete erinevusega (nt standard deviatsioon). Andmete hulgas tuleb registreerida:

a) õhuvoolu kiirused inhalatsiooniseadeldises;

b) õhu temperatuuri ja niiskuse;

c) kontsentratsioonid nominaalväärtustes (katseaine kogumaht, mis sisestatakse inhalatsiooniseadeldisse, jagatud õhu mahuga);

d) osakesi edasikandva aineliik selle kasutamisel;

e) tegelikud kontsentratsioonid katseajal loomade hingamise tsoonides;

f) keskmine osakeste suurus (vajadusel),

— annused (sealhulgas ülekandvaaine annused, kui seda kasutatakse) ja kontsentratsioonid,

— kasvaja esinemissageduse andmed vastavalt soole, annusele ja kasvaja tüüp,

— surmaaeg uuringu ajal või kas loomad elasid kuni uuringu lõppemiseni,

— toksilise mõju andmed soo ja annuste kaupa,

— toksiliste või muude toimete kirjeldus,

— iga normist kõrvalekalduva sümptomi ilmnemise aeg ja edasine kulg,

— andmed toidu ja kehakaalu kohta,

— kasutatud hematoloogilised analüüsid ja kõik tulemused,

— lahanguleiud,

— histopatoloogiliste leidude detailne kirjeldus,

— tulemuste statistiline analüüs koos statistiliste meetodite kirjeldusega,

— tulemuste arutelu,

— tulemuste tõlgendamine.

3.2. **Hinnang ja tõlgendamine**

Vt üldtutvustus B osa.

4. **VIITED**

Vt üldtutvustus B osa.

KOMBINEERITUD KROONILISE TOKSILISUSE/KARTSINOGEENSUSE UURING

1. MEETOD

1.1. Sissejuhatus

Vt üldtutvustus B osa.

1.2. Definitsioonid

Vt üldtutvustus B osa.

1.3. Võrdlusained

Puuduvad.

1.4. Uuringumeetodi põhimõte

Kombineeritud kroonilise toksilisuse/kartsinogeensuse uuringu eesmärk on määrata mingi aine kroonilist toksilisust ja kartsinogeensust imetajatel pikaajalise ekspositsiooni korral.

Sel juhul lisandub kartsinogeensuse uuringule veel vähemalt üks ravitav satelliitrühm ja kontroll-satelliitrühm. Annused, mida kasutatakse suuri annuseid saaval satelliitrühmal, võivad olla suuremad kui kartsinogeensuse uuringu suure annuse rühmas. Kartsinogeensuse uuringus olevaid loomi jälgitakse nii üldise toksilisuse kui ka kartsinogeense toime suhtes. Satelliitrühma loomi jälgitakse üldise toksilisuse suhtes.

Uuritavat ainet antakse tavaliselt seitse päeva nädalas sobival manustamisviisil mitmele katseloomade rühmale. Igale rühmale ordineeritakse kindel uuritava aine annus ja seda manustatakse suurem osa nende loomade elueast. Aine manustamise ajal ja järgselt jälgitakse katseloomi iga päev, et sedastada toksiliste mõjude tunnuseid ja kasvajate arengut.

1.5. Kvaliteedikriteeriumid

Puuduvad.

1.6. Uuringumeetodi kirjeldus

Loomi hoitakse eksperimentaalsetes elamis- ja toitumistingimustes vähemalt 5 päeva enne uuringut. Enne uuringu algust terved noored loomad randomiseeritakse ja määratakse uuritavat ainet saavatesse ning kontrollrühmadesse.

Katseloomad

Eelistatud liigiks on rott. Võttes arvesse eelnevalt läbiviidud uuringute tulemusi, võib kasutada eelmistest katsetest erinevaid loomaliike (närilisi või mitte-närilisi). Kasutada tuleb tavapäraste laboris kasvatatavate liinide noori terveid isendeid ja uuritava aine manustamine peaks algama võimalikult vara peale võõrutamist.

Uuringu alguses ei tohi katseloomade kaal erineda keskmisest kaalust enam kui ±20 %. Kui pikaajalisele uuringule eelneb subkroonilise suukaudse manustamise uuring, tuleb mõlemal juhul kasutada sama loomaliiki/tõugu ja -liini.

Arv ja sugu

Näriliste korral peab igas eri annust saavas rühmas ja samuti kontrollrühmas olema vähemalt 100 isendit (50 emast ja 50 isast). Emasloomad ei tohi olla poeginud ega tiined. Kui plaanitakse vahepealset loomade surmamist, tuleb isendite arvu suurendada vastavalt selle arvu võrra, kui palju loomi kavatsetakse surmata enne uuringu täielikku lõpetamist.

Ravitav satelliitrühm või -rühmad, keda kasutatakse uurimaks muid patoloogiaid peale kasvajate, peaksid sisaldama 20 looma kummastki soost ja satelliit kontrollgrupp peaks sisaldama 10 looma kummastki soost.

Annused ja ekspositsiooni sagedus

Kartsinogeensuse uurimiseks peab lisaks kontrollgrupile kasutama vähemalt kolme erinevat annust saavat rühma. Kõige kõrgem annus peab esile kutsuma minimaalseid toksilisi mõjusid, näiteks kehakaalu juurdekasvu vähene pidurdumine (vähem kui 10 %), ilma et normaalset elukestust mõjutaks teised toimed peale kasvajate.

Madalaim annus ei tohi häirida looma normaalset kasvu, arengut ja pikaealisust või tekitada vähimalgi määral toksilisi mõjusid. Tavaliselt ei tohi madalaim annus olla vähem kui 10 % suurest doosist.

Vahepealne annus või annused tuleb valida suure ja väikse annuse väärtuste vahemiku keskelt.

Annuste valimisel tuleb arvesse võtta eelmiste toksilisuse katsete ja uuringute andmeid.

Kroonilise toksilisuse määramiseks haaratakse uuringusse lisa ravirühmad ja kaasuv satelliit kontrollgrupp. Suur annus ravitaval satelliitrühmal peaks kutsuma esile kindlaid toksilisuse ilminguid.

Kokkupuude uuritava ainega peaks reeglipäraselt toimuma iga päev. Kui kemikaali manustatakse joogiveega või toidu hulka segatult, peavad need olema pidevalt kättesaadavad.

Kontrollrühm

Kasutada tuleb kontrollrühma, mis on igas suhtes identne katserühmaga, erinedes vaid katseainega kokkupuute poolest.

Teatud tingimustel, näiteks inhalatsiooniuuringute korral, mille puhul kasutatakse aerosoole, või suukaudse manustamise uuringute puhul, kui kasutatakse iseloomustamata bioloogilise aktiivsusega emulgaatorit, peab kasutama lisaks ühte kontrollrühma, milles loomad ei puutu kokku vehiikliga.

Manustamisviis

Kolm peamist manustamisviisi on suukaudne, nahakaudne ja inhalatsioon. Valik sõltub katseaine füüsikalistest ja keemilistest omadustest ning aine võimalikust manustamisviisist inimestel.

Suukaudse manustamise uuringud

Kui uuritav aine imendub mao-sooletraktist ja kui allaneelamine on üks võimalikest inimese ekspositsiooni viisidest, eelistatakse vastunäidustuste puudumisel suukaudset manustamist. Loomad võivad saada uuritavat ainet toiduga, lahustatuna joogivees või kapsliga. Ideaaltingimustes annustatakse uuritavat ainet iga päev seitse korda nädalas, sest viiepäevane manustamine võib lubada looma paranemist või toksiliste nähtude taandumist perioodil, kui uuritavat ainet ei manustata. See võib mõjutada tulemusi koos järgneva hinnanguga. Siiski, peamiselt praktilistel kaalutlustel peetakse ka viis päeva nädalas manustamist vastuvõetavaks.

Nahakaudse manustamise uuringud

Nahakaudne manustamine, aine määrimine nahapinnale sobib juhul, kui soovitakse jäljendada selle aine peamist manustamisviisi inimesele ja koostatakse mudel järelduste tegemiseks nahakahjustuste kohta.

Inhalatsiooniuuringud

Et inhalatsiooniuuringud kätkevad endas teiste manustamisviisidega võrreldes mitmeid keerukaid tehnilisi probleeme, on siin toodud detailsemad juhtnöörid selle meetodi kohta. Peab ka märkima, et intratrahheaalne tilgutamine võib olla üks arvestatavaid alternatiivseid meetodeid, et teatud olukordades ainet manustada.

Pikemaajaline ekspositsioon on tavaliselt kavandatud, et jäljendada ekspositsiooni inimesel. Loomade ekspositsioon uuritavale ainega korraldatakse kas kuus tundi päevas viiel päeval nädalas pärast kambri kontsentratsioonide tasakaalustamist (seda nimetatakse vahelduvaks kokkupuuteks) või kasutatakse sarnaselt pidevale keskkonnamõjurile kokkupuute aega 22 kuni 24 tundi seitsmel päeval nädalas (katkematu kokkupuude). Viimasel juhul jääb üks tund päevas loomade söötmiseks, mis peaks toimuma samadel kellaaegadel, ja kambrite korrashoiuks. Mõlema skeemi korral eksponeeritakse loomi ettenähtud ainele kindlatel kontsentratsioonidel. Suurim erinevus vahelduva ja katkematu inhalatsiooniuuringu vahel on see, et esimesel jääb 17- või 18tunnine periood, mil loomad võivad taastuda ekspositsiooni mõjust ja nädalavahetustel on taastumisperiood veelgi pikem.

Vahelduva või katkematu ekspositsiooni valik sõltub uuringu eesmärkidest ning inimesel kasutatavast manustamisviisist, mida tahetakse jäljendada. Siiski tuleb arvestada teatud tehnilisi raskusi. Näiteks katkematu ekspositsiooni eelised keskkonna tingimuste jäljendamiseks võivad saada vastulöögi tehniliste raskuste tõttu, sealhulgas söötmise ja jootmise vajadus ekspositsiooni ajal ning keerukamate (ja usaldusväärsemate) aerosooli- ja aurugeneraatorite ning jälgimistehnika vajadus.

Ekspositsioonikambrid

Katseloomad peavad olema inhalatsioonikambrites, mis on kavandatud nii, et võimaldavad dünaamilist õhuvoolu vähemalt 12 õhuvahetusega tunnis, selleks et kindlustada piisava hapniku ja ühtlaselt jaotunud katseaine sisaldus. Kontrollrühmale ja katserühmale mõeldud kambrid peavad olema ehituslikult ja disainilt samasugused, et tagada kõikides aspektides võrreldavad mõjustustingimused, välja arvatud katseainega kokkupuutumise faktoris. Kambris hoitakse vähene negatiivne rõhk, mis takistab katseaine väljaimbumist ümbritsevasse õhku. Katseloomade tunglemine kambrites peaks olema viidud miinimumini. Üldise reegli kohaselt, selleks et tagada kambri õhkkonna stabiilsus, ei tohi katseloomade kogumaht ületada 5 % kambrimahust.

Kambrites tuleb teostada järgmisi mõõtmisi või kontrolle:

i) õhuvool: eelistatult tuleb õhuvoolu kiirust kambrites jälgida pidevalt;

ii) kontsentratsioon: igapäevase ekspositsiooni ajal ei tohi uuritava aine kontsentratsioon erineda keskmisest väärtusest rohkem kui ±15 %. Uuringu kestel tuleb aine kontsentratsioon hoida päevade lõikes võimalikult ühtlasena;

iii) temperatuur ja niiskus: näriliste jaoks tuleb temperatuur hoida 22 ± 2 °C ja niiskus kambrites peab olema 30 kuni 70 %, välja arvatud juhul, kui eksponeeritava aine viimiseks kambri atmosfääri kasutatakse vett. Soovitatavalt peaks mõlemat faktorit jälgima pidevalt;

iv) osakeste suuruse mõõtmised: osakeste suuruse jaotumust tuleb kambrite atmosfääris määrata nii vedelates kui tahketes aerosoolides. Aerosoolpartiklid peavad olema katseloomadele sissehingamiseks sobiva suurusega. Kambri õhu analüüsid peavad olema võetud aladelt, kus loomad hingavad. Õhu analüüsid peavad iseloomustama nende osakeste jaotumust, millele katseloomi eksponeeritakse, ja neid tuleb aerosoolheljumites gravimeetriliselt analüüsida, isegi kui suur osa aerosoolist ei ole võimalik sisse hingata. Generaatorsüsteemi väljatöötamisel tuleb sagedasti teha osakeste suuruse analüüse, et selgitada aerosooli stabiilsust. Edaspidi tuleb analüüse teha nii tihti kui vaja, et määrata adekvaatselt loomadele kokkupuuteks vajaliku aine partiklite jaotuvuse ühtlust.

Uuringu kestus

Kartsinogeensuse uuringu kestus hõlmab tavaliselt suurema osa katseloomade elueast. Uuring peaks lõppema hiirtel ja hamstritel 18 kuu järel ja rottidel 24 kuu järel. Siiski, teatud pikemaealistel ja/või kasvaja madala spontaanse tekkimise kiirusega liinidel peaks uuring lõppema hiirtel ja hamstritel 24. kuul ja rottidel 30. kuul. Teine võimalus on lõpetada selline laiaulatuslik uuring juhul, kui ellujäänute arv madalaimat annust saanud loomarühmas või kontrollrühmas ulatub 25 %. Kui katset lõpetades ilmneb elusolevatel isendite hulgas väljendunud sooline erinevus, peab iga sugu analüüsima eraldi. Kui loomad surevad enneaegselt selgelt sedastatavate toksiliste nähtude tõttu ainult kõrge annusega uuringugrupis ja need toksilised mõjud ei põhjusta probleeme teistes gruppides, ei pruugi seetõttu uuringut lõpetada. Negatiivne uurimustulemus on vastuvõetav, kui mitte üheski grupis ei kaotatud katseajal üle 10 % isenditest autolüüsi, kannibalismi või hooldamise probleemide tõttu ja ühegi grupi elulemus ei ole vähem kui 50 % 18. kuul hiirte ja hamstrite kasutamisel ning 24. kuul rottide korral.

Satelliitrühmad, milles on 20 looma kummastki soost koos vastavate kontrollidega (10 looma kummastki soost), peaksid jääma uuringusse vähemalt 12 kuuks. Need loomad tuleks plaanipäraselt surmata määramaks uuritava ainega seotud patoloogiat, ilma et seda komplitseeriks gerontoloogilised muutused.

Protseduur

Vaatlused

Iga päev puuri juures tehtavad vaatlused peaksid hõlmama naha ja karvkatte, silmade ja limaskestade, aga ka hingamis-, vereringe- ning autonoomse ja tsentraalse närvisüsteemi muutusi, somatomotoorset aktiivsust ja käitumismustrit.

Ravitava(te)sse satelliitrühma(de)sse kuuluvaid loomi tuleks sobivate ajavahemike järel kliiniliselt uurida.

Loomade regulaarne jälgimine on vajalik, tagamaks niipalju kui võimalik, et loomad ei langeks katsest välja sellistel põhjustel nagu kannibalism, kudede autolüüs või loomade vale paigutus. Surnud loomad tuleb kohe eemaldada, surmata ja lahata.

Kõikide loomade kliinilised andmed tuleb registreerida, sealhulgas neuroloogilised ja silmas toimuvad muutused, aga ka suremus. Erilist tähelepanu tuleb pöörata kasvajate tekkimisele: iga nähtava või palpeeritava tuumori puhul tuleb märkida märkamisaeg, lokalisatsioon, mõõtmed, väline kuju ja levik; samuti tuleb registreerida toksilise seisundi tekke ja progresseerumise aeg, samuti kasvajakahtlus.

Toidu tarbimist (ja joogi tarbimist, kui katseaine manustatakse joogivee kaudu) hinnatakse igal nädalal uuringu esimesel kolmeteistkümnel nädalal ja seejärel ligikaudu 3kuuliste intervallidega, kui loomade tervislik seisund või kehakaalu muutused ei nõua teisiti.

Iga looma kehakaal tuleb registreerida eraldi korra nädalas katseperioodi esimesel kolmeteistkümnel nädalal ja seejärel vähemalt korra nelja nädala jooksul.

Kliinilised uuringud

Hematoloogiline uuring

Hematoloogiline uuring (näiteks hemoglobiini sisaldus, leukotsüütide absoluutarv, trombotsüütide arv või teised vere hüübimisvõimet peegeldavad näitajad) tuleks teostada kolme kuu järel, kuue kuu järel ja seejärel umbes kuuekuuliste intervallidega ning uuringu lõpetamisel kõikidel loomadel mittenäriliste liikide puhul ja rottide puhul kümnel loomal kummaski soost igas rühmas. Kui võimalik, tuleks kõikidel ajamomentidel võtta analüüsid samadelt rottidelt.

Kui kliiniliste vaatluste käigus ilmneb loomade tervisliku seisundi halvenemine, tuleks nendel loomadel teha vereanalüüs rakkude valemi loendamisega.

Verevalem loendatakse suure annuse rühma ja kontrollrühma kuuluvate loomade vereanalüüsist. Järgmises madalama annusega grupis tuleb valem loendada ainult juhtudel, kui suure annuse rühma ja kontrollrühma vahel ilmnes oluline lahknemine või kui see on näidustatud patoloogiliste leidude tõttu.

Uriinianalüüs

Uriinianalüüsid võetakse kümnelt loomalt kummaski soost iga rühma kohta. Võimaluse korral tuleks analüüsid koguda samadelt rottidelt samade intervallidega nagu hematoloogiliseks uuringuks. Järgmised näitajad määratakse kas kõikidel loomadel eraldi või kokkusegatud proovist/soo/uuringurühma kohta:

— välimus: maht ja tihedus igal loomal eraldi,

— valk, glükoos, ketoonid, peiteveri (poolkvantitatiivselt),

— sademe mikroskoopia (poolkvantitatiivselt).

Kliiniline keemia

Vereanalüüse kliinilise keemia uuringuteks võetakse umbes kuuekuulise intervalliga ja uuringu lõpetamisel kõikidelt loomadelt mittenäriliste liikide puhul ja kümnelt rotilt kummastki soost kõikides rühmades; võimaluse korral tuleks igal ajahetkel võtta analüüs samadelt loomadelt. Lisaks kogutakse mittenäriliste liikidel uuringu eelsed analüüsid. Proovidest eraldatakse plasma ja tehakse järgmised määramised:

— valgu kontsentratsioon,

— albumiini kontsentratsioon,

— maksafunktsiooni näitajad (nagu alkaalse fosfataasi aktiivsus, glutamaadi püruvaattransaminaasi ([1]) aktiivsus, glutamaadi oksaloatsetaattransaminaasi ([2]) aktiivsus), gammaglutamüüli transpeptidaas, ornitiini dekarboksülaas,

— süsivesikute metabolism, nagu näiteks tühja kõhu glükoos,

— neerufunktsiooni näitajad, nagu vere uurea lämmastik.

([1]) Praegu tuntud kui aspartaadi aminotransferaas.
([2]) Praegu tuntud kui alaniini aminotransferaas.

Lahang

Lahang teostatakse kõikidele loomadele, kaasa arvatud nendele, kes surid katseajal või surmati, kuna leiti suremas. Enne surmamist tuleb vererakkude valemi loendamiseks koguda vereproovid kõikidelt loomadelt. Säilitada tuleb kõik makroskoopiliselt nähtavad kasvajad või kasvaja kahtlased lesioonid. Tuleks püüda leida korrelatsiooni makroskoopiliste ja mikroskoopiliste leidude vahel.

Kõik järgmised organid või koed tuleb säilitada vastavates keskkonnatingimustes võimalikeks hilisemateks histopatoloogilisteks uuringuteks: ajukude [1] (piklikaju/ajusild, väikeaju ja suuraju korteks), ajuripats, kilpnääre (sealhulgas kõrvalkilpnääre), harknääre, kopsud (koos trahheaga), süda, aort, süljenäärmed, maks, [1] põrn, neerud, [1] neerupealised, [1] söögitoru, magu, kaksteistsõrmiksool, tühi- ja niudesool, umbsool, jämesool, pärasool, emakas, kusepõis, lümfisõlmed, kõhunääre, suguorganid, [1] lisasugunäärmed, nahk, emasloomadel piimanäärmed, lihaskond, perifeerne närv, selja-aju kolmel tasandil (kaelaosa, keskmine rinnaosa ja nimmeosa), rinnak koos luuüdiga, reieluu koos liigesega ja silmad.

Kopsude ja kusepõie parimaks säilitamiseks tuleb nad puhuda fikseerivat ainet täis; täispuhutud kopsud on inhalatsioonikatsete korral olulise tähtsusega korralikuks histopatoloogiliseks analüüsiks. Inhalatsiooniuuringute korral peab säilitama kogu hingamiselundkonna, sealhulgas ninaõõne, neelu ja kõri.

Kui teostatakse teisi kliinilisi uuringud, peaks neist saadav informatsioon olema kättesaadav enne mikroskoopilisi uuringuid, sest need võivad anda patoloogile väärtuslikke juhtnööre.

Histopatoloogiline uuring

Kroonilise toksilisuse osa jaoks:

Kõigi säilitatud organite ja kudede detailne uuring tuleb teha suurt annust saavasse satelliitrühma ja kontrollrühma kuuluvatel loomadel. Kui suure annuse rühmas leitakse uuritava ainega seostatav patoloogia, tuleks kõikidesse teistesse ravi saavatesse satelliitrühmadesse kuuluvatel loomadel, samuti kartsinogeensuse uuringus olevatel loomadel uuringu lõpetamisel teostada selle organi detailne histoloogiline uuring.

Kartsinogeensuse osa jaoks:

a) täielik histopatoloogiline uuring tuleb viia läbi kõikide uuringuperioodil surnud või surmatud loomade organitel ja kudedel ja kõikidel kontrollrühma ja suurt annust saanud rühma kuulunud loomadel;

b) kõik selgelt nähtavad kasvajad või kasvajakahtlased kahjustused tuleb kõikides rühmades mikroskoopiliselt kontrollida;

c) neoplastiliste kahjustuste olulise erinevuse korral kõrge annusega rühmas ja kontrollrühmas tuleb teistes rühmades teostada vastava organi või koe histopatoloogiline uuring;

d) kui suure annuse rühmas on elulemus märkimisväärselt madalam kui kontrollgrupil, tuleb täielik uuring teostada madalama annuse rühmast järgmise grupi isenditele;

e) kui esineb tõendeid, et kõrge annusega rühma loomadel on toksilisi või teisi nähtusid, mis võivad mõjutada neoplastilist reaktsiooni, tuleb täielik uuring teostada madalama annusega rühmast järgmise rühma isenditele.

2. ANDMED

Andmed tuleb esitada kokkuvõtliku tabelina, näidates iga katsegrupi puhul loomade arvu katse alguses; isendite arvu, kellel ilmnevad katse ajal kasvajad või toksilisuse nähud; nende sedastamise aeg ja loomade arv, kellel peale surmamist leiti kasvajaid. Tulemused tuleb hinnata sobiva statistilise meetodiga. Kasutada võib iga tunnustatud statistilist meetodit.

3. ARUANNE

3.1. Uuringu raport

Uuringu raport peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

— loomaliik, liin, päritolu, keskkonnatingimused, dieet,

[1] Need organid tuleb näriliste puhul kaaluda kümnel loomal kummastki soost iga rühma kohta.

— katsetingimused:

Ekspositsiooniseadeldise kirjeldus:

Tuleb märkida seadeldise disain, tüüp, mõõtmed, õhu lähteallikas, osakesi ja aerosoole tootev süsteem, õhu konditsioneerimise meetod, heitõhu töötlemine, loomade majutamise korraldus testkambrites, kui neid kasutatakse. Kirjeldada tuleb temperatuuri ja niiskuse mõõtmise vahendeid ning vajadusel aerosooli kontsentratsiooni stabiilsust ja osaksete suurust.

Andmed ekspositsiooni kohta:

Andmed tuleb esitada tabelina ja esitada keskmiste väärtustena ja variaabluse näitajatega (nt standarddeviatsioon). Andmete hulgas tuleb registreerida:

a) õhuvoolu kiirused inhalatsiooniseadeldises;

b) õhu temperatuur ja niiskus;

c) kontsentratsioonid nominaalväärtustes (katseaine kogumaht, mis sisestatakse inhalatsiooniseadeldisse jagatud õhu mahuga);

d) vehiikli olemus, kui seda kasutatakse;

e) tegelikud kontsentratsioonid katseajal loomade hingamise tsoonides;

f) keskmine osakeste suurus (vajadusel),

— annused (sealhulgas ülekandvaaine annused, kui seda kasutatakse) ja kontsentratsioonid,

— kasvaja esinemissageduse andmed vastavalt soole, annusele ja kasvaja tüüp,

— surmaaeg uuringu ajal või kas loomad elasid kuni uuringu lõppemiseni,

— toksilise mõju andmed soo ja annuste kaupa,

— toksiliste või muude toimete kirjeldus,

— iga normist kõrvalekalduva sümptomi ilmnemise aeg ja edasine kulg,

— oftalmoloogilised leiud,

— andmed toidu ja kehakaalu kohta,

— kasutatud hematoloogilised analüüsid ja kõik tulemused,

— kasutatud kliinilise biokeemia analüüsid ja kõik tulemused (sealhulgas uriinianalüüs),

— lahanguleiud,

— histopatoloogiliste leidude detailne kirjeldus,

— tulemuste statistiline analüüs koos statistiliste meetodite kirjeldusega

— tulemuste arutelu,

— tulemuste tõlgendamine.

3.2. **Hinnang ja tõlgendamine**

Vt üldtutvustus B osa.

4. **VIITED**

Vt üldtutvustus B osa.

ÜHE PÕLVKONNA REPRODUKTSIOONITOKSILISUSE UURING

1. **MEETOD**

1.1. **Sissejuhatus**

Vt üldtutvustus B osa.

1.2. **Definitsioonid**

Vt üldtutvustus B osa.

1.3. **Võrdlusained**

Puuduvad.

1.4. **Uuringumeetodi põhimõte**

Uuritavat ainet manustatakse gradueeritud annustes mitmele isas- ja emasloomade rühmale. Isasloomadele tuleks ainet manustada kasvuperioodil ja vähemalt ühe täieliku spermatogeneesi tsükli (ligikaudu 56 päeva hiirel ja 70 päeva rotil) vältel, et võimaldada ükskõik milliste uuritava aine poolt tekitatavate ebasoovitavate kõrvalmõjude toimimist spermatogeneesile.

Emasloomadele tuleks uuritavat ainet manustada vähemalt kahe täieliku innatsükli vältel, et võimaldada ükskõik milliste uuritava aine poolt tekitatavate ebasoovitavate kõrvalmõjude toimimist östrusele. Seejärel loomad paaritatakse. Uuritavat ainet manustatakse mõlemast soost loomadele paaritumisperioodi jooksul, seejärel ainult emasloomadele tiinuse ja imetamisperioodi vältel.

Uuritava aine manustamiseks inhalatsioonina tuleb meetodit modifitseerida.

1.5. **Kvaliteedikriteeriumid**

Puuduvad.

1.6. **Uuringumeetodi kirjeldus**

Ettevalmistused

Enne uuringu algust jagatakse terved katseloomad juhuslikkuse alusel kontroll- ja katserühmadesse. Loomi peetakse eksperimentaalsetes söötmis- ja pidamistingimustes vähemalt viie päeva vältel enne uuringu algust.

On soovitatav, et uuritavat ainet manustatakse söödas või joogivees. Teised manustamisviisid on samuti aktsepteeritavad. Kõigile loomadele tuleks manustada uuritavat ainet kogu katseperioodi vältel samal meetodil. Kui manustamise lihtsustamiseks kasutatakse vehiiklit või mõnda muud lisandit, peaks olema teada, et need ei oma toksilisi toimeid.

Aine manustamine peaks toimuma kõigil seitsmel nädalapäeval.

Katseloomad

Liikide valik

Eelistatud liikideks on rott ja hiir. Kasutada tuleks terveid loomi, keda pole varem rakendatud mingites katseprotseduurides. Madala viljakusega liine ei tohiks kasutada. Katseloomi iseloomustatakse liigi, liini, soo, kaalu ja/või vanuse järgi.

Viljakuse adekvaatseks hindamiseks tuleks uurida nii isas- kui emasloomi. Kõik katse- ja kontroll-loomad peaksid olema enne uuringu algust võõrutatud.

Arv ja sugu

Igas katse- ja kontrollrühmas peaks olema piisavalt loomi, et tulemuseks oleks umbes 20 lõpptiinet emaslooma.

Eesmärgiks on piisava hulga tiinuste ja järglaste saamine, et kindlustada aine potentsiaalsete mõjude tähendusrikas hindamine viljakusele, tiinusele, emaslooma käitumisele P generatsioonis, imetamisele, ning F_1 järglaste kasvule ja arengule viljastumisest suguküpsuseni.

Katsetingimused

Sööta ja vett peaks katseloomadele võimaldama *ad libitum*. Poegimise lähenedes tuleks tiined emased paigutada eraldi poegimis- või pesapuuridesse, kuhu neile võib paigutada ka pesategemiseks sobivaid materjale.

Annused

Uuringus tuleks kasutada vähemalt kolme katserühma ja kontrollrühma. Kui uuritava aine annustamiseks kasutatakse vehiiklit, tuleks seda kontrollrühmale manustada selle kõige suuremas kasutatavas koguses. Kui uuritav aine põhjustab söödatarbimise või söödakasutuse langust, võib osutuda vajalikuks paralleelselt söödetava kontrollrühma kasutamine. Ideaalselt, kui seda ei piira uuritava aine keemilised, füüsikalised või bioloogilised omadused, peaks kõrgeim doos põhjustama toksilisuse nähte, kuid mitte suremust vanemate (P) põlvkonna loomadel. Keskmine annus või annused peaksid põhjustama minimaalseid uuritavale ainele omistatavaid toksilisuse nähte ja madalaim annus ei tohiks põhjustada mingeid märgatavaid ebasoovitavaid uuritavale ainele omistatavaid toimeid ei vanematel ega järglastel. Kui manustamine toimub soni abil või kapslitena, peaks iga looma individuaalne annus põhinema tema kehamassil ja seda tuleks igal nädalal kohandada vastavalt kehakaalu muutustele. Emasloomade annus võib tiinuse ajal soovi korral põhineda nende kehamassil tiinuse 0- või 6. päeval.

Piirtest

Madala toksilisusega ainete puhul ei pruugi katsed teiste annustega vajalikuks osutuda, kui vähemalt 1 000 mg/kg annuse juures ei ilmne mingeid tunnuseid reproduktiivfunktsioonide häirumisest. Kui eelnevast uuringust suurte annuste tasemel, kindlate toksilisuse tunnustega emasloomal, ei nähtu mingeid ebasoovitavaid toimeid viljakusele, ei pruugi katsed teiste annustega vajalikuks osutuda.

Uuringu läbiviimine

Katsegraafikud

Uuritava aine igapäevast manustamist vanemate (P) põlvkonna isasloomadele tuleks alustada, kui nad on umbes viie kuni üheksa nädala vanused, peale võõrutamist ja aklimatiseerimist vähemalt viie päeva vältel. Rottide puhul jätkatakse manustamist 10 nädala jooksul enne paaritamisperioodi (hiirte puhul 8 nädalat). Isasloomad tuleks hukata ja uurida peale paaritusperioodi lõppu, või, teise võimalusena, võib isasloomi pidada katseratsioonil võimaliku teise pesakonna produtseerimiseni ning hukata ja uurida mingil ajaperioodil enne uuringu lõppu. Uuritava aine manustamine vanemate (P) põlvkonna emasloomadele peaks algama peale vähemalt viie päeva pikkust aklimatisatsiooniperioodi ja vältama paaritamise eelselt vähemalt kaks nädalat. Uuritava aine igapäevane manustamine P emasloomadele peaks jätkuma kolmenädalase paaritumisperioodi, tiinuse ja imetamise vältel kuni F_1 järglaste võõrutamiseni. Annustamisskeemi modifitseerimist tuleks kaaluda juhtudel, kui uuritava aine kohta on lisaandmeid, näiteks aine metabolismi või bioakumulatsiooni puudutavat teavet.

Paaritusprotseduur

Viljakust mõjutava toksilisuse uurimustes võib kasutada kas 1:1 (üks isane ühe emase kohta) või 1:2 (üks isane kahe emase kohta) paaritusi.

1:1 paaritusel korral tuleks üks emane panna kokku sama isasega kuni tiinuse ilmnemise või kolme nädala möödumiseni. Igal hommikul tuleks emasloomi uurida sperma või tupekorkide avastamiseks. Tiinuse 0-päevaks loetakse päeva, mil leitakse sperma või tupekork.

Katseloomi, kes ei paaritu, tuleks uurida eeldatava viljatuse põhjuste kindlaks tegemiseks. See võib hõlmata selliseid protseduure, nagu lisavõimalused paaritumiseks teiste tõestatud viljakusega emas- või isasloomadega, suguorganite mikroskoopiline uurimine ja innatsüklite või spermatogeneesi uurimine.

Pesakondade suurused

Viljakuse uurimuses kasutatavatel loomadel võimaldatakse poegida normaalsel viisil ja kasvatada järglasi kuni võõrutamiseni ilma pesakondade standardiseerimiseta.

Kui kasutatakse standardiseerimist, on soovitav rakendada allpool toodud protseduuri. 1. ja 4. poegimisjärgse päeva vahel võib iga pesakonna suurust korrigeerida, eemaldades valikuliselt liigsed pojad nii, et tulemuseks oleks võimalikult täpselt neli emast ja neli isast pesakonna kohta. Kui emaste või isaste poegade arv ei võimalda koostada pesakonda neljast kummastki soost pojast, on sobiv ka osaline korrigeerimine (nt viis isast ja kolm emast). Korrigeerimine ei ole kohaldatav pesakondadele, kus on vähem kui kaheksa poega. F_2 pesakondade korrigeerimine viiakse läbi samal viisil.

Jälgimine

Kogu uurimisperioodi vältel tuleks katseloomi jälgida vähemalt kord päevas. Registreerida tuleks asjakohased käitumise muutused, raske või pika poegimise tunnused ja kõik toksilisusele viitavad tunnused, sealhulgas suremus. Paaritamiseelse ja paaritamisperioodi vältel tuleks söödatarbimist mõõta kord nädalas. Soovi korral võib tiinuse jooksul iga päev mõõta söödatarbimist. Pärast poegimist ja imetamise jooksul tuleks söödatarbimist mõõta samal päeval, kui toimub pesakondade kaalumine. P emaseid ja isaseid loomi tuleks kaaluda annustamise esimesel päeval ja seejärel kord nädalas. Need tähelepanekud tuleks registreerida iga looma kohta individuaalselt.

Tiinusperioodi kestus tuleks arvutada tiinuse 0-päeva aluseks võttes. Iga pesakonda tuleks pärast sündi võimalikult ruttu uurida, et teha kindlaks poegade arv ja sugu, surnultsünnid, elussünnid ja tugevate kõrvalekallete olemasolu.

Surnud ja 4. päeval hukatud pojad tuleks säilitada ja uurida võimalike defektide avastamiseks. Elusad pojad tuleks loendada ja pesakonnad kaaluda sünnijärgsel hommikul, 4. ja 7. päeval ja seejärel kord nädalas kuni uuringu lõpuni, mil loomi kaalutakse individuaalselt. Emasloomal ja poegadel täheldatud käitumuslikud või füüsilised kõrvalekalded tuleb registreerida.

Patoloogia

Lahang

Peale surma või hukkamist tuleks kõiki P generatsiooni loomi mikroskoopiliselt uurida tuvastamaks mistahes ehituslikke kõrvalekaldeid või patoloogilisi muutusi, pöörates erilist tähelepanu sigimisorganitele. Surnud või surevaid poegi tuleks uurida defektide tuvastamiseks.

Histopatoloogia

Kõigi P generatsiooni katseloomade munasarjad, emakas, emakakael, tupp, munandid, munandimanused, seemnepõied, teised lisasugunäärmed, eesnääre, hüpofüüs ja sihtorgan(id) tuleb säilitada mikroskoopiliseks uurimiseks. Juhul, kui neid organeid pole uuritud teistes hulgiannustega uuringutes, tuleks neid mikroskoopiliselt uurida kõigil suurimat annust saanud ja kontrollrühma loomadel, paaritamiseks valitud loomadel, ja kui see on teostatav, siis ka loomadel, kes surid uuringu vältel.

Kõrvalekallete avastamisel organites, tuleks samu organeid uurida ka teistesse annuserühmadesse kuulunud loomadel. Nendel juhtudel tuleks mikroskoopiline uurimine läbi viia kõigi kudede puhul, milles ilmnevad makroskoopilised patoloogilised muutused. Nagu on soovitatud alajaotuses "Paaritusprotseduur", võib mikroskoopilisele uurimisele allutada ka sigimatuses kahtlustatavate katseloomade sigimisorganid.

2. ANDMED

Andmed tuleks võtta kokku tabeli vormis, näidates iga katserühma kohta loomade arvu uuringu alguses, tiinete loomade arvu, muutuste tüübi ja iga tüüpi muutuse puhul nende loomade suhtarv, kellel see esines.

Võimaluse korral tuleks arvuliste tulemuste hindamiseks kasutada sobivat statistilist meetodit. Kasutada võib ükskõik millist üldiselt aktsepteeritud statistilist meetodit.

3. ARUANNE

3.1. Uuringu raport

Uuringu raport peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

— kasutatud liik/liin,

— toksilise mõju andmed soo ja annuste kaupa, kaasa arvatud viljakuse, tiinuse ja elulemuse indeksid,

— surmaaeg uuringu ajal või kas loomad elasid kuni uuringu lõpetamiseni,
— tabelina esitatud iga pesakonna kaal, poja keskmine kehamass ja poegade individuaalsed kehamassid hukkamisel,
— toksilised või muud mõjud sigivusele, järglastele ja sünnijärgsele kasvule,
— iga kõrvalekalde täheldamise päev ja selle edasine areng,
— paaritamiseks valitud P ja F loomade kehamassi andmed,
— lahanguleiud,
— kõigi mikroskoopiliste leidude üksikasjalik kirjeldus,
— tulemuste statistiline töötlus, kus sobiv,
— tulemuste arutelu,
— tulemuste interpretatsioon.

3.2. **Hindamine ja interpretatsioon**

Vt üldtutvustus B osa.

4. **VIITED**

Vt üldtutvustus B osa.

KAHE PÕLVKONNA REPRODUKTSIOONITOKSILISUSE UURING

1. MEETOD

1.1. Sissejuhatus

Vt üldtutvustus B osa.

1.2. Definitsioonid

Vt üldtutvustus B osa.

1.3. Võrdlusained

Puuduvad.

1.4. Uuringumeetodi põhimõte

Uuritavat ainet manustatakse gradueeritud annustes mitmele isas- ja emasloomade rühmale. Vanemate (P) põlvkonna isasloomadele tuleks ainet manustada kasvuperioodil ja vähemalt ühe täieliku spermatogeneesi tsükli (ligikaudu 56 päeva hiirel ja 70 päeva rotil) vältel, et võimaldada ükskõik milliste uuritava aine poolt tekitatavate ebasoovitavate kõrvalmõjude toimimist spermatogeneesile.

Vanemate (P) põlvkonna emasloomadele tuleks uuritavat ainet manustada vähemalt kahe täieliku innatsükli vältel, et võimaldada ükskõik milliste uuritava aine poolt tekitatavate ebasoovitavaid kõrvalmõjusid toimimist östrusele. Seejärel loomad paaritatakse. Uuritavat ainet manustatakse mõlemast soost loomadele paaritumisperioodi jooksul, seejärel ainult emasloomadele tiinuse ja imetamisperioodi vältel. Peale võõrutamist jätkatakse aine manustamist F_1 põlvkonna järglastele nende täiskasvanuks saamise, paaritumise ja F_2 põlvkonna produtseerimise jooksul, kuni F_2 põlvkond on võõrutatud. Uuritava aine manustamiseks inhalatsioonina tuleb meetodit modifitseerida.

1.5. Kvaliteedikriteeriumid

Puuduvad.

1.6. Uuringumeetodi kirjeldus

Ettevalmistused

Enne uuringu algust jagatakse terved katseloomad juhuslikkuse alusel kontroll- ja katserühmadesse. Vanemate (P) põlvkonna loomi peetakse eksperimentaalsetes söötmis- ja pidamistingimustes vähemalt viie päeva vältel enne uuringu algust. On soovitatav, et uuritavat ainet manustatakse söödas või joogivees. Teised manustamisviisid on samuti aktsepteeritavad. Kõigile loomadele tuleks manustada uuritavat ainet kogu katseperioodi vältel samal meetodil. Kui manustamise lihtsustamiseks kasutatakse vehiiklit või mõnda muud lisandit, peaks olema teada, et need ei oma toksilisi toimeid. Aine manustamine peaks toimuma kõigil seitsmel nädalapäeval.

Katseloomad: liikide valik

Eelistatud liikideks on rott ja hiir.

Tuleks kasutada terveid P loomi, keda pole varem kasutatud mingites katseprotseduurides. Madala viljakusega liine ei tohiks kasutada. Katseloomi iseloomustatakse liigi, liini, soo, kaalu ja/või vanuse järgi.

Viljakuse adekvaatseks hindamiseks tuleks uurida nii isas- kui emasloomi. Kõik katse- ja kontroll-loomad peaksid olema enne uuringu algust võõrutatud.

Arv ja sugu

Igas katse- ja kontrollrühmas peaks olema piisavalt loomi, et tulemuseks oleks umbes 20 lõpptiinet emaslooma. Eesmärgiks on piisava hulga tiinuste ja järglaste saamine, et kindlustada aine potentsiaalsete mõjude tähendusrikas hindamine viljakusele, tiinusele, emaslooma käitumisele, imetamisele, ning F_1 järglaste kasvule ja arengule viljastumisest suguküpsuseni ja nende järglaste (F_2) arengule kuni võõrutamiseni.

Katsetingimused

Sööta ja vett peaks katseloomadele võimaldama *ad libitum*. Poegimise lähenedes tuleks tiined emased paigutada eraldi poegimis- või pesapuuridesse, kuhu neile võib paigutada ka pesategemiseks sobivaid materjale.

Annused

Uuringus tuleks kasutada vähemalt kolme katserühma ja kontrollrühma. Kui uuritava aine annustamiseks kasutatakse vehiiklit, tuleks seda kontrollrühmale manustada selle kõige suuremas kasutatavas koguses. Kui uuritav aine põhjustab söödatarbimise või söödakasutuse langust, võib osutuda vajalikuks paralleelselt söödetava kontrollrühma kasutamine. Ideaalselt, kui seda ei piira uuritava aine keemilised, füüsikalised või bioloogilised omadused, peaks kõrgeim doos põhjustama toksilisuse nähte, kuid mitte suremust vanemate (P) põlvkonna loomadel. Keskmine annus või annused peaksid põhjustama minimaalseid uuritavale ainele omistatavaid toksilisuse nähte ja madalaim annus ei tohiks põhjustada mingeid märgatavaid ebasoovitavaid uuritavale ainele omistatavaid toimeid ei vanematel ega järglastel. Kui manustamine toimub sundsöötmise teel või kapslitena, peaks iga looma individuaalne annus põhinema tema kehamassil ja seda tuleks igal nädalal kohandada. Emasloomade annus võib tiinuse ajal soovi korral põhineda nende kehamassil tiinuse 0- või 6. päeval.

Piirtest

Madala toksilisusega ainete puhul ei pruugi katsed teiste annustega vajalikuks osutuda, kui vähemalt 1 000 mg/kg annuse juures ei ilmne mingeid tunnuseid reproduktiivfunktsioonide häirumisest. Kui eelnevast uuringust suurte annuste tasemel, kindlate toksilisuse tunnustega emasloomal, ei nähtu mingeid ebasoovitavaid toimeid viljakusele, ei pruugi katsed teiste annustega vajalikuks osutuda.

Uuringu läbiviimine

Katsegraafikud

Uuritava aine igapäevast manustamist vanemate (P) põlvkonna isasloomadele tuleks alustada, kui nad on umbes viie kuni üheksa nädala vanused, peale võõrutamist ja aklimatiseerimist vähemalt viie päeva vältel. Rottide puhul jätkatakse manustamist 10 nädala jooksul enne paaritamisperioodi (hiirte puhul 8 nädalat). Isasloomad tuleks hukata ja uurida peale paaritusperioodi lõppu, või teise võimalusena võib isasloomi pidada katseratsioonil võimaliku teise pesakonna produtseerimiseni ning hukata ja uurida mingil ajaperioodil enne katse lõppu.

Uuritava aine manustamine vanemate (P) põlvkonna emasloomadele peaks algama peale vähemalt viie päeva pikkust aklimatisatsiooniperioodi ja vältama paaritamise eelselt vähemalt kaks nädalat. Uuritava aine igapäevane manustamine P emasloomadele peaks jätkuma kolmenädalase paaritumisperioodi, tiinuse ja imetamise vältel kuni F_1 järglaste võõrutamiseni. Annustamisskeemi modifitseerimist tuleks kaaluda juhtudel, kui uuritava aine kohta on lisaandmeid, näiteks aine metabolismi või bioakumulatsiooni puudutav teave.

Uuritava aine manustamine F_1 katseloomadele algab võõrutamisel ja kestab kuni nende hukkamiseni.

Paaritusprotseduur

Viljakust mõjutava toksilisuse uurimustes võib kasutada kas 1:1 (üks isane ühe emase kohta) või 1:2 (üks isane kahe emase kohta) paaritusi.

1:1 paaritusel korral tuleks üks emane panna kokku sama isasega kuni tiinuse ilmnemise või kolme nädala möödumiseni. Igal hommikul tuleks emasloomi uurida sperma või tupekorkide avastamiseks. Tiinuse 0-päevaks loetakse päeva, mil leitakse sperma või tupekork. Arvestades spermatogeneesiga, ei tohiks F_1 järglasi paaritada enne, kui nad on hiirte puhul vähemalt 11 nädalat, rottide puhul 13 nädalat vanad. F_1 järglaste paaritamiseks valitakse igast pesakonnast juhuslikkuse alusel üks isane ja üks emane, keda paaritatakse teise sama doositaseme katserühma pesakonna järglasega F_2 põlvkonna saamiseks. F_1 emas- ja isasloomad, keda ei kasutata paaritamiseks, hukatakse võõrutamisel.

Katseloomi, kes ei paaritu, tuleks uurida eeldatava viljatuse põhjuste kindlaks tegemiseks. See võib hõlmata selliseid protseduure, nagu lisavõimalused paaritumiseks teiste tõestatud viljakusega emas- või isasloomadega, suguorganite mikroskoopiline uurimine ja innatsüklite või spermatogeneesi uurimine.

Pesakondade suurused

Viljakuse uurimuses kasutatavatel loomadel võimaldatakse poegida normaalsel viisil ja kasvatada järglasi kuni võõrutamiseni ilma pesakondade standardiseerimiseta.

Kui kasutatakse standardiseerimist, on soovitav rakendada allpool toodud protseduuri. 1. ja 4. poegimisjärgse päeva vahel võib iga pesakonna suurust korrigeerida, eemaldades valikuliselt liigsed pojad nii, et tulemuseks oleks võimalikult täpselt neli emast ja neli isast pesakonna kohta. Kui emaste või isaste poegade arv ei võimalda koostada pesakonda neljast kummastki soost pojast, on sobiv ka osaline korrigeerimine (nt viis isast ja kolm emast). Korrigeerimine ei ole kohaldatav pesakondadele, kus on vähem kui kaheksa poega. F_2 pesakondade korrigeerimine viiakse läbi samal viisil.

Jälgimine

Kogu uurimisperioodi vältel tuleks katseloomi jälgida vähemalt kord päevas. Registreerida tuleks asjakohased käitumise muutused, raske või pika poegimise tunnused ja kõik toksilisusele viitavad tunnused, sealhulgas suremus. Paaritamiseelse ja paaritamisperioodi vältel tuleks söödatarbimist mõõta kord nädalas. Soovi korral võib tiinuse jooksul iga päev mõõta söödatarbimist. Pärast poegimist ja imetamise jooksult tuleks söödatarbimist mõõta samal päeval, kui toimub pesakondade kaalumine. Vanemloomi (P and F_1) tuleks kaaluda annustamise esimesel päeval ja seejärel kord nädalas. Need tähelepanekud tuleks registreerida iga looma kohta individuaalselt.

Tiinusperioodi kestus tuleks arvutada tiinuse 0-päeva aluseks võttes. Iga pesakonda tuleks pärast sündi võimalikult ruttu uurida, et teha kindlaks poegade arv ja sugu, surnultsünnid, elussünnid ja tugevate kõrvalekallete olemasolu.

Surnud ja 4. päeval hukatud pojad tuleks säilitada ja uurida võimalike defektide avastamiseks. Elusad pojad tuleks loendada ja pesakonnad kaaluda sünnijärgsel hommikul, 4. ja 7. päeval ja seejärel kord nädalas kuni uuringu lõpuni, mil loomi kaalutakse individuaalselt. Emasloomal ja poegadel täheldatud käitumuslikud või füüsilised kõrvalekalded tuleb registreerida.

Patoloogia

Lahang

Kõik täiskasvanud P ja F_1 katseloomad tuleks surmata, kui nad pole enam vajalikud, hindamaks toimeid paljunemisele. F_1 järglased, keda ei valitud paaritamiseks ja kõik F_2 järglased tuleks hukata peale võõrutamist.

Peale surma või hukkamist tuleks kõik vanemgeneratsioonide (P and F_1) loomi mikroskoopiliselt uurida tuvastamaks ükskõik milliseid ehituslikke kõrvalekaldeid või patoloogilisi muutusi, pöörates erilist tähelepanu sigimisorganitele. Surnud või surevaid poegi tuleks uurida defektide tuvastamiseks.

Histopatoloogia

Kõigi P ja F_1 katseloomade munasarjad, emakas, emakakael, tupp, munandid, munandimanused, seemnepõied, teised lisasugunäärmed, eesnääre, hüpofüüs ja sihtorgan(id) tuleb säilitada mikroskoopiliseks uurimiseks. Juhul, kui neid organeid pole uuritud teistes hulgiannustega uuringutes, tuleks neid mikroskoopiliselt uurida kõigi kõrgeimat annust saanud ja kontrollrühma P ja F_1 loomadel, paaritamiseks valitud loomadel, ja kui see on teostatav, siis ka loomadel, kes surid uuringu vältel. Kõrvalekallete avastamisel organites, tuleks samu organeid uurida ka teistesse annuserühmadesse kuulunud loomadel. Nendel juhtudel tuleks mikroskoopiline uurimine läbi viia kõigi kudede puhul, milles ilmnevad makroskoopilised patoloogilised muutused. Nagu on soovitatud alajaotuses "Paaritusprotseduur", võib mikroskoopilisele uurimisele allutada ka sigimatuses kahtlustatavate katseloomade sigimisorganid.

2. **ANDMED**

Tulemuste töötlus

Andmed tuleks võtta kokku tabeli vormis, näidates iga katserühma kohta loomade arvu uuringu alguses, tiinete loomade arvu, muutuste tüübi ja iga tüüpi muutuse puhul nende loomade suhtarv, kellel see esines.

Võimaluse korral tuleks arvuliste tulemuste hindamiseks kasutada sobivat statistilist meetodit. Kasutada võib ükskõik millist üldiselt aktsepteeritud statistilist meetodit.

3. **ARUANNE**

3.1. **Uuringu raport**

Uuringu raport peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

— kasutatud liik/liin,

— toksilise mõju andmed soo ja annuste kaupa, kaasa arvatud viljakuse, tiinuse ja elulemuse indeksid,

— surmaaeg uuringu ajal või kas loomad elasid kuni uuringu lõpetamiseni,

— tabelina esitatud iga pesakonna kaal, poja keskmine kehamass ja poegade individuaalsed kehamassid hukkamisel,

— toksilised või muud mõjud sigivusele, järglastele ja sünnijärgsele kasvule,

— iga kõrvalekalde täheldamise päev ja selle edasine areng,

— paaritamiseks valitud P ja F_1 loomade kehamassi andmed,

— lahanguleiud,

— kõigi mikroskoopiliste leidude üksikasjalik kirjeldus,

— tulemuste statistiline töötlus, kus sobiv,

— tulemuste arutelu,

— tulemuste interpretatsioon.

3.2. **Hindamine ja interpretatsioon**

Vt üldtutvustus B osa.

4. **VIITED**

Vaata üldtutvustus B osa.

TOKSIKOKINEETIKA

1. MEETOD

1.1. Sissejuhatus

Vt üldtutvustus B osa.

1.2. Definitsioonid

Vt üldtutvustus B osa.

1.3. Võrdlusained

Puuduvad.

1.4. Uuringumeetodi põhimõte

Uuritavat ainet manustatakse sobival viisil. Sõltuvalt uuringu eesmärgist võib ainet manustada ühekordsete või korduvate annustena kindla ajaperioodi jooksul ühele või mitmele katseloomade grupile. Olenevalt uuringu tüübist määratakse aine ja/või selle metaboliitide sisaldus kehavedelikes, kudedes ja/või ekskreetides.

Uuringuid võib teostada uuritava aine "märgistatud" või "mittemärgistatud" vormiga. Kui kasutatakse märgistust, peab see olema liidetud uuritava ainega nii, et see võimaldab saada enim informatsiooni aine käitumise kohta.

1.5. Kvaliteedikriteeriumid

Puuduvad.

1.6. Uuringumeetodi kirjeldus

Ettevalmistused

Terved noored täiskasvanud loomad aklimatiseeritakse laboritingimustes vähemalt viie päeva jooksul enne testi algust. Enne testi loomad randomiseeritakse ja määratakse uuritavatesse gruppidesse. Erijuhtudel võib kasutada väga noori, tiineid või eelnevalt mõjutatud loomi.

Katsetingimused

Katseloomad

Toksikokineetilisi uuringuid võib korraldada ühe või enama sobiliku loomaliigiga, mida on kasutatud või kavatsetakse kasutada teistes sama uuritava ainega teostatud toksikokineetilistes uuringutes. Kui testimiseks kasutatakse närilisi, ei tohi nende kehakaal erineda keskmisest enam kui ±20 %.

Arv ja sugu

Absorptsiooni ja ekskretsiooni uuringutes peaks igas annuserühmas algselt olema neli looma. Sooline eelistus ei ole kohustuslik, kuid mõningatel juhtudel võib vajalikuks osutuda mõlema sugupoole uurimine. Kui reaktsioonides on soolised erinevused, tuleb kummastki soost uurida nelja looma. Kui uuringus ei kasutata närilisi, võib kasutada vähem loomi.

Kui uuritakse aine jaotuvust kudedes, peaks grupi suuruse määramisel arvesse võtma nii igal planeeritud ajahetkedel surmatavate loomade hulka, kui ka valitud ajahetkede koguarvu.

Kui uuritakse ainevahetust, on grupi suurus sõltuv uuringu vajadustest.

Mitme annusetaseme ning mitme vahepealse ajapunktiga uuringutes tuleks rühma suurusel arvesse võtta vaheetappide ja surmamiste arvu, kuid rühm ei tohi olla väiksem kui kaks looma. Rühma suurus peaks olema piisav iseloomustamaks uuritava aine ja/või metaboliitide omastamist, platood ja lagunemist (kui vajalik).

Annused

Ühekordse annuse manustamise puhul tuleks kasutada vähemalt kahte erinevat annust. Kasutama peaks väikest annust, mille juures ei ilmne toksilisi efekte ning suurt annust, mille puhul võivad tekkida muutused toksikokineetilistes parameetrites või ilmnevad toksilisuse efektid.

Korduval manustamisel piisab tavaliselt väikestest annustest, kuid teatud tingimustes võib vaja minna ka suuri annuseid.

Manustamisviis

Toksikokineetilistes uuringutes tuleks kasutada samu manustamisviise ning, kui võimalik, samu vehiikleid, mida on kasutatud või kavatsetakse kasutada teistes toksilisuse uuringutes. Uuritavat ainet manustatakse katseloomadele tavaliselt suu kaudu maosondiga või söögiga, kutaanselt või inhaleeritava õhuga kindla ajavahemiku jooksul. Uuritava aine intravenoosne manustamine võib osutuda kasulikuks, kui uuritakse suhtelist imendumist teiste manustamisviiside puhul. Lisaks võib pärast uuritava aine intravenoosset manustamist saada kasulikku informatsiooni selle kudedes jaotumise seaduspärasuste kohta.

Arvesse tuleks võtta aine manustamiseks kasutatavate vehiiklite ja uuritava aine vahelist mõju. Tähelepanu tuleks pöörata absorptsiooni erinevustele, kui kasutatakse uuritava aine manustamist sondiga või söögiga, ning vajadusele annuse täpseks määramiseks, eriti kui uuritav aine manustatakse koos söögiga.

Jälgimisaeg

Kõiki loomi tuleks iga päev jälgida ning märkida üles toksilisuse nähud ja teised kliiniliselt olulised ilmingud, muu hulgas nende tekke aeg, aste ja kestus.

Protseduur

Pärast katseloomade kaalumist manustatakse uuritav aine sobivat teed pidi. Loomi võib hoida näljas enne uuritava aine manustamist, kui seda peetakse oluliseks.

Imendumine

Uuritava aine imendumise kiirust ja ulatust võib hinnata erinevate meetodite abil, kas koos või ilma referentsgrupita, ([1]) näiteks:

— määrata uuritava aine ja/või metaboliitide hulka ekskreetides, nagu uriin, sapp, väljaheide, väljahingatav õhk või looma karkass,

— võrrelda bioloogilisi vastuseid (nt ägeda toksilisuse uuringud) uuritava ja kontroll- ja/või referentsgrupi vahel,

— võrrelda neerude kaudu erituvat uuritava aine ja/või metaboliitide hulka test- ja referentsgrupi loomadel,

— uuritava aine ja/või metaboliitide plasmakontsentratsiooni ja aja kõvera aluse pindala kindlakstegemine ning test- ja referentsgrupi andmete võrdlemine.

([1]) Selles meetodis on referentsgrupiks grupp, kellele uuritav aine manustatakse viisil, mis tagab annuse täieliku biosaadavuse.

Jaotumine

Käesoleval hetkel kasutatakse kahte meetodit, millest ühte või mõlemat võib kasutada jaotuvuse kindlakstegemiseks:

— kasulikku kvalitatiivset informatsiooni saab kasutades kogu keha autoradiograafilisi tehnikaid,

— kvantitatiivset informatsiooni saab loomade surmamisest erinevatel vaheetappidel pärast loomade uuritavale ainele eksponeerimist ning uuritava aine ja/või metaboliitide kontsentratsiooni ja hulga määramisest kudedes ja organites.

Eritumine

Ekskretsiooni uuringutes kogutakse uriin, väljaheide, väljahingatav õhk ja mõningatel juhtudel sapp. Uuritava aine ja/või metaboliitide hulka ekskreetides tuleks pärast ekspositsiooni mõõta mitmeid kordi, kuni umbes 95 % manustatud annusest on eritunud, või 7 päeva jooksul (ükskõik, kumb jõuab kätte esimesena).

Erijuhtudel tuleb arvestada uuritava aine eritumist lakteeriva katselooma piimaga.

Metabolism

Metabolismi ulatuse ja seaduspärasuste kindlakstegemiseks peaks analüüsima bioloogilisi näidiseid, kasutades selleks sobilikke tehnikaid. Metaboliitide struktuur tuleks välja selgitada ning esitada sobivad metabolismi teed, kui on vaja vastata varasemates toksikoloogilistes uuringutes tekkinud küsimustele. Informatsiooni saamisel metabolismi teede kohta võivad kasulikuks osutuda *in vitro* uuringud.

Metabolismi ja toksilisuse vahekorra kohta võib lisainfot saada biokeemilistest uuringutest, näiteks metaboliseerivate ensüümide süsteemide toime kindlakstegemisest, endogeensete mitte-proteiin sulfüdrüül komponentide lagunemisest ja aine seondumisest makromolekulidega.

2. ANDMED

Olenevalt uuringu tüübist peavad andmed olema summeeritud tabelikujul, koos graafilise esitlusega, kui vajalik. Iga testrühma kohta tuleb näidata mõõtmiste keskmine ja statistiline variatsioon suhtes aja ja annusega, vajadusel näidata ära koed ja organid. Sobivate meetoditega tuleks kindlaks määrata absorptsiooni ulatus ning ekskretsiooni kogus ja tase. Kui teostatakse metabolismi uuringuid, tuleks esitada kindlakstehtud metaboliitide struktuur ja arvatavad metabolismi teed.

3. ARUANNE

3.1. Uuringu raport

Vastavalt uuringu tüübile peab uuringu raport võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

— loomaliik, liin, päritolu, keskkonnatingimused, dieet,

— märgistatud ainete iseloomustus, kui on kasutatud,

— annuste tase ja manustamise intervall,

— manustamisetee(d), kõik kasutatud vehiiklid,

— täheldatud toksilised ja teised efektid,

— uuritava aine ja/või metaboliitide kindlakstegemise meetodid bioloogilistes näidistes, kaasa arvatud väljahingatav õhk,

— andmed soo, annuse, režiimi, aja, kudede ja organite kohta tabelina,

— absorptsiooni ja ekskretsiooni esitamine ajas,
— meetodid metaboliitide iseloomustamiseks ja identifikatsiooniks bioloogilistes näidistes,
— meetodid metabolismiga seotud biokeemiliste mõõtmiste kohta,
— metabolismi arvatav tee,
— tulemuste arutelu,
— tulemuste interpretatsioon.

3.2. **Hinnang ja interpretatsioon**

Vt üldtutvustus B osa.

4. **VIITED**

Vt üldtutvustus B osa.

MUTAGEENSUSE JA KARTSINOGEENSUSE UURING

GEENMUTATSIOON – *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1. MEETOD

1.1. Sissejuhatus

Vt üldtutvustus B osa.

1.2. Definitsioon

Vt üldtutvustus B osa.

1.3. Võrdlusained

Puuduvad.

1.4. Uuringumeetodi põhimõte

Pärmseene *Saccharomyces cerevisiae* erinevaid haploidseid ja diploidseid tüvesid saab kasutada keemiliste ainete poolt põhjustatud geenmutatsioonide uurimiseks koos metabolismi aktiveerimisega või ilma.

Haploidsete tüvede puhul on kasutusel otsemutatsiooni süsteemid**,** näiteks mõõtes mutatsiooni punasest, adeniin-sõltuvast mutandist (*ade*-1, *ade*-2), topelt adeniin-sõltuvaks valgeks mutandiks, ja selektiivsed süsteemid, nagu resistentsuse induktsioon kanavnaiinile ja tsükloheksimiidile.

Kõige laialdasemalt tunnustatud pöördmutatsioonisüsteem hõlmab haploidse tüve XV 185-14C kasutamist, mis kannab ooker-nonsenss-mutatsioone *ade* 2-1, *arg* 4-17, *lys* 1-1 ja *trp* 5-48. Need mutatsioonid on pöörduvad baasasendatavate mutageenide poolt, mis indutseerivad kohaspetsiifilisi mutatsioone või ooker-supressor mutatsioone. XV 185-14C kannab ka *his* 1-7 markerit, missense-mutatsiooni, mis on pöörduv peamiselt sekundaarsete mutatsioonikohtade poolt, ja *hom* 3-10 markerit, mis on pöörduv raaminihke mutageenide poolt.

Diploidsete *S. cerevisiae* tüvede korral on ainukeseks laialdaselt kasutatavaks tüveks $D_{7,}$ mis on homosügootne *ilv* 1-92 suhtes.

1.5. Kvaliteedikriteeriumid

Puuduvad.

1.6. Uuringumeetodi kirjeldus

Ettevalmistused

Testitava aine ja kontroll-lahused tuleb valmistada vahetult enne testimise alustamist, kasutades sobilikke vehiikleid. Vees mittelahustuvate orgaaniliste koostisosiste puhul ei tohiks kasutada rohkem kui 2 % orgaaniliste ainete lahustamiseks sobivaid lahusteid, näiteks etanool, atsetoon või dimetüülsulfoksiid (DMSO). Abiaine lõplik kontsentratsioon ei tohiks oluliselt mõjutada raku eluvõimet ja kasvu karakteristikuid.

Metaboolne aktivatsioon

Rakud tuleks eksponeerida testitavale kemikaalile nii sobivate eksogeensete metabolismi aktiveerivate süsteemide juuresolekul, kui ka ilma.

Kõige sagedamini kasutatavaks süsteemiks on kofaktor, mille koostises on eelnevalt ensüümindutseeriva ainega mõjutatud näriliste maksast saadav post-mitokondriaalne fraktsioon. Metaboolseks aktivatsiooniks võib kasutada ka teisi loomaliike, kudesid, post-mitokondriaalseid fraktsioone või protseduure.

Uuringu tingimused

Test-tüvi

Geenmutatsiooni uuringutes on kõige kasutatavamad haploidne tüvi XV 185-14C ja diploidne tüvi D_7. Teiste tüvede kasutamine võib olla kohane.

Rakusööde

Elulemuse ja mutantide arvu kindlakstegemiseks kasutatakse sobivaid rakusöötmeid.

Positiivsete ja negatiivsete kontrollide kasutamine

Positiivsed, töötlemata ja lahuse kontrollid tuleb teostada samaaegselt. Iga spetsiifilise mutatsioonilise tulemusnäitaja puhul tuleks kasutada sobivaid positiivse kontrolli kemikaale.

Ekspositsiooni kontsentratsioon

Testimisel peaks kasutama vähemalt viit piisavalt erinevat testitava aine kontsentratsiooni. Toksiliste ainete puhul ei tohiks kõrgeim testitav kontsentratsioon vähendada elulemust alla 5–10 %. Vees mittelahustuvad ained tuleks testida lahustuvuspiirini, kasutades selleks sobivaid meetodeid. Vabalt vees lahustuvate mittetoksiliste ainete puhul tuleks maksimaalne kontsentratsioon määrata üksikjuhtumite kaupa.

Inkubatsiooni tingimused

Alusklaase inkubeeritakse seitse päeva 28–30 °C juures pimedas.

Spontaansete mutatsioonide sagedus

Tuleks kasutada subkultuure, mille spontaansete mutatsioonide sagedus on aktsepteeritud normivahemikus.

Replikatsioonide arv

Raku eluvõime ja geenmutatsiooni poolt produtseeritud prototroofide analüüsimiseks tuleks kasutada vähemalt kolme replikatsiooni-alusklaasi iga testitava aine kontsentratsioonivääртuse kohta. Kui kasutatakse madala mutatsioonitasemega markereid, nagu *horn* 3-10, tuleb alusklaaside arvu suurendada, et saada statistiliselt olulisi andmeid.

Protseduur

S. cerevisiae tüvede töötlus sooritatakse tavaliselt vedeltesti meetodil latentsete või paljunevate rakkudega. Algsed katsed tuleks teha paljunevate rakkudega: $1–5×10^7$ rakku/ml eksponeeritakse testitavale kemikaalile kuni 18 tunni jooksul temperatuuril 28–37 °C, aegajalt loksutades; piisav kogus metabolismi aktiveerivat süsteemi lisatakse töötluse käigus sobilikul ajahetkel. Töötluse lõpus rakud tsentrifuugitakse, pestakse ja külvatakse sobivale rakusöötmele. Pärast inkubatsiooni hinnatakse alusklaase rakkude elulemuse ja mutatsioonide induktsiooni osas.

Kui esimene katse on negatiivne, tuleks läbi viia teine katse kasutades latentse faasi rakke. Kui esimene katse on positiivne, kinnitatakse see sobiva sõltumatu uuringuga.

2. **ANDMED**

Andmed tuleks esitada tabelivormis, näidates loendatud kolooniate arvu, mutantide arvu, elulemuse ja mutantide sageduse. Kõik tulemused tuleks kinnitada sõltumatu uuringuga. Andmeid tuleks töödelda sobivaid statistilisi meetodeid kasutades.

3. **ARUANNE**

3.1. **Uuringu raport**

Uuringu raport peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

— kasutatav tüvi,

— katsetingimused: latentses faasis või paljunevad rakud, rakusöötme koostis, inkubatsioonitemperatuur ja kestus, metabolismi aktiveeriv süsteem,

— töötluse tingimused: ekspositsiooni tase, töötluse meetod ja kestus, töötluse temperatuur, positiivsed ja negatiivsed kontrollid,

— loendatud kolooniate arv, mutantide arv, elulemuse ja mutantide sagedus, doos/vastus suhe (kui oluline), andmete statistiline hinnang,

— tulemuste diskussioon

— tulemuste interpretatsioon.

3.2. **Hinnang ja interpretatsioon**

Vt üldtutvustus B osa.

4. **VIITED**

Vt üldtutvustus B osa.

MITOOTILINE REKOMBINATSIOON – *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

1. MEETOD

1.1. Sissejuhatus

Vt üldtutvustus B osa.

1.2. Definitsioon

Vt üldtutvustus B osa.

1.3. Võrdlusained

Puuduvad.

1.4. Uuringumeetodi põhimõte

Saccharomyces cerevisiae mitootilist rekombinatsiooni saab määrata geenide vahel (üldisemalt geeni ja selle tsentromeeri vahel) või geenide sees. Esimest nimetatakse mitootiliseks ristsiirdeks, mille tulemuseks on retsiprooksed produktid, teist geeni konversiooniks, mis on kõige sagedamini mitte-retsiprookne. Ristsiiret analüüsitakse tavaliselt retsessiivsete homosügootsete kolooniate produktsiooni järgi või heterosügootsete tüvede poolt produtseeritud sektorite järgi. Geeni konversiooni analüüsitakse prototroofsete revertantide produktsiooni järgi, mida toodavad kahte erinevat sama geeni defektset alleeli kandvad auksotroofsed heteroalleelsed tüved. Kõige sagedamini kasutatavad tüved mitootilise geeni konversiooni kindlakstegemiseks on D_4 (heteroalleelne *ade* 2-s and *trp* 5-s), D_7 (heteroalleelne *trp* 5-s), BZ_{34} (heteroalleelne *arg* 4-s) ja JD1 (heteroalleelne *his* 4-s ja *trp* 5-s). Mitootilist ristsiiret, mis produtseerib punaseid ja roosasid homosügootseid sektoreid, saab analüüsida D_5-s või D_7-s (mis mõõdavad ka mitootilist geeni konversiooni ja pöördmutatsiooni *ilv* 1-92-s), mõlemad tüved on heteroalleelsed *ade 2* komplementaarsete alleelide osas.

1.5. Kvaliteedikriteeriumid

Puuduvad.

1.6. Uuringumeetodi kirjeldus

Ettevalmistused

Testitava kemikaali ja kontroll- või võrdluslahused tuleks valmistada vahetult enne testimist, kasutades sobivaid vehiikleid. Vees mittelahustuvate orgaaniliste koostisosade puhul ei tohiks kasutada rohkem kui 2 % orgaaniliste ainete lahustamiseks sobivaid lahusteid, näiteks etanool, atsetoon või dimetüülsulfoksiid (DMSO). Vehiikli lõplik kontsentratsioon ei tohiks oluliselt mõjutada raku eluvõimet ja kasvu omadusi.

Metaboolne aktivatsioon

Rakud tuleks eksponeerida testitavale kemikaalile nii sobiva eksogeense metabolismi aktiveeriva süsteemi juuresolekul, kui ilma. Kõige sagedamini kasutatavaks süsteemiks on kofaktor, mille koostises on eelnevalt ensüümindutseeriva ainega mõjutatud näriliste maksast saadav post-mitokondriaalne fraktsioon. Ka teiste liikide, kudede, post-mitokondriaalsete fraktsioonide või meetodite kasutamine metaboolseks aktivatsiooniks on lubatud.

Katsetingimused

Test-tüved

Kõige sagedamini kasutatavad tüved on diploidsed D_4, D_5, D_7 ja JD1. Teiste tüvede kasutamine võib olla kohane.

Rakusööde

Mitootilise rekombinatsiooni ja elulemuse sageduse hindamiseks kasutatakse sobivaid rakusöötmeid.

Positiivsete ja negatiivsete kontrollide kasutamine

Positiivsed, mittetöödeldud ja lahusti kontrollid peaksid olema teostatud samaaegselt. Iga spetsiifilise rekombinatsiooni tulemusnäitaja puhul tuleks kasutada sobivaid positiivse kontrolli kemikaale.

Ekspositsiooni kontsentratsioonid

Tuleks kasutada vähemalt viit piisavalt erinevat testitava aine kontsentratsiooni. Uuritavate faktorite hulgas peavad, muude hulgas, olema tsütotoksilisus ja lahustuvus. Kõige madalam kontsentratsioon ei tohi mõju avaldada raku eluvõimele. Toksiliste ainete puhul ei tohiks kõrgeim testitav kontsentratsioon vähendada elulemust alla 5–10 %. Vees mittelahustuvaid kemikaale tuleks testida lahustuvuspiirini, kasutades selleks sobivaid meetodeid. Vabalt vees lahustuvate mittetoksiliste ainete kõrgeim kontsentratsioon tuleb määrata üksikjuhtumite kaupa.

Rakke võib eksponeerida testitavale kemikaalile kas latentses või paljunemisfaasis kuni 18 tunni jooksul. Pika töötlemisaja puhul tuleks kultuure uurida mikroskoopiliselt spooride moodustumise aspektist, spooride olemasolu tühistab testi tulemuse.

Inkubatsioonitingimused

Alusklaase inkubeeritakse pimedas neli kuni seitse päeva temperatuuril 28–30 °C. Alusklaase, mida kasutatakse mitootilise ristsiirde poolt produtseeritud punaste ja roosade homosügootsete sektorite analüüsimiseks, tuleks enne loendust hoida üks kuni kaks päeva külmikus (umbes 4 °C juures), mis võimaldab sobivate pigmenteeritud kolooniate tekke.

Spontaanne mitootilise rekombinatsiooni sagedus

Tuleks kasutada subkultuuri, mille spontaanse mitootilise rekombinatsiooni mutatsiooni sagedus on aktsepteeritud normivahemikus.

Replikatsioonide arv

Elulemuse ja mitootilise geenikonversiooni poolt produtseeritud prototroofide analüüsimiseks tuleks kasutada vähemalt kolme replikatsiooni-alusklaasi iga testitava aine kontsentratsiooni kohta. Mitootilise ristsiirde poolt produtseeritud retsessiivse homosügoosi analüüsimiseks tuleks alusklaaside arvu suurendada, et saada piisavat kolooniate arvu.

Protseduur

S. cerevisiae tüvede töötlus sooritatakse tavaliselt vedeltesti meetodil, kasutatakse latentseid või paljunevaid rakke. Algsed katsed tuleks teha paljunevate rakkudega. $1–5×10^7$ rakku/ml eksponeeritakse testitavale kemikaalile kuni 18 tunniks temperatuuril 28–37 °C koos loksutamisega; piisav kogus metabolismi aktiveerivat süsteemi lisatakse töötluse käigus sobilikul ajahetkel.

Töötluse lõpus rakud tsentrifugeeritakse, pestakse ja külvatakse sobivale rakusöötmele. Pärast inkubatsiooni hinnatakse alusklaase rakkude elulemuse ja mitootilise rekombinatsiooni induktsiooni osas.

Kui esimene katse on negatiivne, tuleks teostada teine katse kasutades latentse faasi rakke. Kui esimene katse on positiivne, kinnitatakse see sõltumatu uuringuga.

2. **ANDMED**

Andmed tuleks esitada tabelivormis, näidates ära loendatud kolooniate arvu, rekombinantide arvu, elulemuse ja rekombinantide sagedus.

Tulemused tuleks kinnitada sõltumatu uuringuga.

Andmeid tuleks töödelda sobivaid statistilisi meetodeid kasutades.

3. **ARUANNE**

3.1. **Uuringu raport**

Uuringu raport peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

— kasutatud tüvi,

— katsetingimused**:** latentse faasi või paljunevad rakud, kultuuri koostis, inkubatsioonitemperatuur ja kestus, metabolismi aktiveeriv süsteem,

— töötluse tingimused: ekspositsiooni kontsentratsioon, meetod ja töötluse kestus, töötluse temperatuur, positiivsed ja negatiivsed kontrollid,

— loendatud kolooniate arv, rekombinantide arv, elulemus ja rekombinantide sagedus, doos/vastus suhe (kui oluline), andmete statistiline hinnang,

— tulemuste arutelu,

— tulemuste interpretatsioon.

3.2. **Hinnang ja interpretatsioon**

Vt üldtutvustus B osa.

4. **VIITED**

Vt üldtutvustus B osa.

IN VITRO GEENMUTATSIOONI UURIMINE IMETAJARAKUL

1. **MEETOD**

1.1. **Sissejuhatus**

Vt üldtutvustus B osa.

1.2. **Definitsioon**

Vt üldtutvustus B osa.

1.3. **Võrdlusained**

Puuduvad.

1.4. **Uuringumeetodi põhimõte**

Keemiliste ühendite indutseeritud mutatsioonide hindamiseks on võimalik kasutada imetajate rakukultuure. Laialdaselt kasutatavate rakukultuuride hulka kuuluvad hiire lümfoomirakud L5178Y, CHO ja Hiina hamstri V-79 rakuliinid. Kõige sagedamini kasutatavate uurimismeetoditega on võimalik teha kindlaks mutatsioone tümidiini kinaasi (TK), hüpoksantiinguaniinfosforibosüültransferaasi (HPRT) ([1]) ja Na^+/K^+ ATPaasi geenilookustes. TK ja HPRT geenilookuste uurimisel on sedastatavad aluspaaride mutatsioonid, raaminihke mutatsioonid ja mikrodeletsioonid. Na^+/K^+ ATPaasi lookust uurivad meetodid on võimelised määrama ainult aluspaaride mutatsioonide olemasolu.

Rakud, milles $TK^+ - TK^-$ mutatsiooni tõttu puudub tümidini kinaas (TK), ei suuda metaboliseerida bromodeoksüuridiini (BrdU), fluorodeoksüuridiini (FdU) või trifluorotümidiini (TFT). Tulemusena eelmainitud antimetaboliitide tsütotoksiline toime ei avaldu. Antimetaboliitidele resistentses rakus säilivad normipärased protsessid ning metabolismiks vajalike nukleotiidide süntees *de novo*. Tümidiini kinaasi olemasolul BrdU, FdU või TFT liidetakse ensümaatiliselt nukleotiididele. Resultaadiks on tsütotoksilisuse avaldumine ning rakumetabolismi inhibeerumine. Normaalsed rakud, mis sisaldavad tümidiini kinaasi, ei ole võimelised prolifereeruma BrdU, FdU või TFT juuresolekul. Mutatsioone sisaldavad rakud aga säilitavad antimetaboliitide juuresolekul proliferatsioonivõime. HPRT defitsiidi korral selekteeruvad rakud 8-azaguaniini (AG) või 6-tioguaniini (TG) resistentsuse järgi. Rakud muutustega Na^+/K^+ ATPaasi lookuses on resistentsed ouabaiini toimele.

Uuritava aine tsütotoksilisuse hindamiseks mõõdetakse tema poolt avaldatavat toimet rakukultuuride kasvukiirusele ning nende võimele kolooniaid moodustada (kloneerimisefektiivsus). Mutantsete rakkude tekkesagedus kindlaks tegemiseks külvatakse teatud hulk rakke söötmele, mis sisaldab muteerunud rakke selekteerivat ainet. Teine osa rakke kultiveeritakse vastavat ainet mittesisaldavale söötmele ja määratakse rakkude üldine eluvõimelisus. Peale optimaalset inkubatsiooniperioodi rakukolooniad loendatakse. Mutantsete rakkude esinemissagedus saadakse mutantsete kolooniate arvu korrigeerimisel rakuliini üldise elulemuse järgi.

1.5. **Kvaliteedikriteeriumid**

Puuduvad.

1.6. **Uuringumeetodi kirjeldus**

Ettevalmistused

Kasutatavad rakud

Antud katses on võimalik kasutada erinevaid rakuliine. Sealhulgas L5178Y subkloone, CHO rakke või V-79 rakke. Eelduseks on säilinud tundlikkus keemilise mutageeni suhtes, kõrge kloneerimisefektiivsus ja madal spontaansete mutatsioonide tekkesagedus. Periooditi tuleb kontrollida rakkude karüotüübi stabiilsust ja võimalikku kontaminatsiooni *Mycoplasma*'ga. Teisi rakutüüpe võib kasutada eeldusel, et keemiliselt indutseeritud geenmutatsioonide teket on neil kogu katse ulatuses võimalik dokumenteerida.

([1]) Varasema terminoloogia järgi HGPRT.

Keskkond

Tagatud peavad olema optimaalsed söötme ja inkubatsiooni tingimused (temperatuur, külvialus, CO_2 kontsentratsioon ja niiskusaste). Keskkonna ja söötme valik sõltub katses kasutatavatest süsteemidest ja rakutüüpidest.

Uuritav aine

Uuritava aine võib ette valmistada kultiveerimiskeskkonnas või lahustada või suspendeerida vastavas lahustis enne rakkude töötlemist. Lahusti lõppkontsentratsioon kultiveerimiskeskkonnas ei tohi mõjutada rakkude elulemust ega kasvukiirust.

Metaboolne aktivatsioon

Rakud peaksid olema eksponeeritud uuritavale ainele nii imetaja metaboolse aktivatsioonisüsteemi olemasolul kui ka selle puudumisel. Kui kasutatakse sisemist metaboolset aktiivsust omavaid rakutüüpe, peab tegema kindlaks, et rakkude metabolismi kiirus ja aktiivsuse iseloom vastavad tingimustele.

Katsetingimused

Positiivsete ja negatiivsete kontrollide kasutamine

Igas eksperimendis peab rakendama positiivset kontrolli rakkudele otsest mõju avaldava ühendiga ja ka ühendiga, mille toime avaldumiseks on vajalik metaboolse aktiivsuse olemasolu. Samuti on vajalik negatiivne kontroll (lahusti).

Positiivsete kontrollidena võib kasutada:

— otsest toimet avaldavad ühendid:

  — etüülmetaansulfonaat,

  — etrenool,

— kaudse toimega ühendid:

  — 2-atsetüülaminofluoreen,

  — DMBA (7,12-dimetüülbensantratseen),

  — N-nitrosodimetüülamiin.

Kui võimalik, võib kasutada positiivse kontrollina uuritava ühendiga samasse keemilisse klassi kuuluvat toimeainet.

Kasutatud kontsentratsioonid

Testis tuleb kasutada erineva uuritava aine kontsentratsiooniga lahuseid. Eesmärgiks on teha kindlaks kontsentratsioonist sõltuv toksiline efekt. Efekti olemasolul peaks kõrge uuritava aine kontsentratsiooniga lahuse toime järel rakkude elulemus langema ning väikese kontsentratsiooniga lahuse toime järel peaks rakkude elulemus olema ligikaudu sama, mis negatiivses kontroll-lahuses.

Vees suhteliselt halvasti lahustuvaid aineid tuleks vastavate meetodite abil uurida lahustuvuse piirini. Täielikult veeslahustuvatele mittetoksilistele ainetele tuleb maksimaalne kontsentratsioonimäär valida vastavalt iga katse vajadusele.

Protseduur

Kultuuris kasutatavate rakkude arv sõltub iseeneslike mutatsioonide sagedusest. Üldjuhul saadakse kasutatavate rakkude hulk, kui spontaansete mutatsioonide esinemissageduse pöördarv korrutada kümnega.

Rakud peaksid toksilise ainega kokku puutuma sobiva aja jooksul, enamikul juhtudel on efektiivseks vahemikuks kaks kuni viis tundi. Piisava sisemise metaboolse aktiivsuseta rakud peaksid uuritava ainega kokku puutuma nii metaboolset aktivatsiooni esilekutsuva süsteemi olemasolul kui ka puudumisel. Kokkupuuteaja lõppemisel pestakse rakud uuritavast ainest puhtaks ning külvatakse söötmele, et määrata eluvõimeliste rakkude hulk ja võimaldada mutantsel fenotüübil avalduda.

Avaldumisperioodi lõpus, mis peab olema piisavalt pikk võimaldamaks esilekutsutud mutatsioonide võimalikult optimaalset fenotüübilist avaldumist, külvatakse rakud selekteerivat ainet mittesisaldavale söötmele, et määrata eluvõimeliste ja mutantrakkude arv.

Tulemuste tõesus kinnitatakse eraldi uuringuga.

2. **ANDMED**

Andmed tuleks võtta kokku tabeli vormis. Loenduse tulemused tuleb esitada eraldi uuritava aine ja kontrolli kohta nii mutatsiooni esilekutsumise kui ka elulemuse osas. Samuti peab olema välja toodud keskmine kolooniate arv ühe alusklaasi kohta ja standardhälve. Mutatsioonisagedus tuleb avaldada muteerunud rakkude arvu ja eluvõimeliste rakkude arvu suhtena. Elulemuse ja kloonide produtseerimise võime esitatakse protsendina kontrolltasemest.

Andmete analüüsi peab teostama sobivate statistiliste meetodite abil.

3. **ARUANNE**

3.1. **Uuringu raport**

Uuringu raport peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

— kasutatud rakuliin, rakukultuuride arv, rakukultuuride säilitusmeetodid,

— katsetingimused: söötme koostis, CO_2 kontsentratsioon, uuritava aine kontsentratsioon, kasutatud vehiikel, inkubatsiooni temperatuur, inkubatsiooni aeg, ekspressiooniperioodi pikkus (sealhulgas külvatud rakkude ja subkultuuride arv, säilitusmeetodid) töötluse kestus, rakutihedus töötlemise ajal, imetajaraku metaboolset aktiivsust omava süsteemi tüüp, positiivsed ja negatiivsed kontrollid, kasutatud selektiivsed ained,

— annuse valiku põhimõte,

— eluvõimeliste ja mutantsete rakkude loendamismeetod,

— statistiline hindamine,

— tulemuste arutelu,

— tulemuste interpretatsioon.

3.2. **Hinnang ja interpretatsioon**

Vt üldtutvustus B osa.

4. **VIITED**

Vt üldtutvustus B osa.

DNA KAHJUSTAMINE JA PARANDAMINE – PLAANIVÄLINE DNA SÜNTEES – IMETAJATE RAKKUDEL *IN VITRO*

1. MEETOD

1.1. Sissejuhatus

Vt üldtutvustus B osa.

1.2. Definitsioon

Vt üldtutvustus B osa.

1.3. Võrdlusained

Puuduvad.

1.4. Uuringumeetodi põhimõte

Plaanivälise DNA sünteesi (PDS) test mõõdab DNA reparatiivset sünteesi pärast keemiliste ja füüsikaliste tegurite poolt kahjustatud DNA segmendi väljalõikamist. Test põhineb triitiumiga märgistatud tümidiini (^{3}H-TdR) sisestamisel sünteesifaasis (S) mitteoleva imetajaraku DNA-sse. Radioaktiivse tümidiini (^{3}H-TdR) seondumist töödeldud rakkude DNA-ga võib määrata autoradiograafiliselt või vedelik-stsintillatsiooniloenduri (VSL) abil. Imetajarakkude kultuuri, juhul kui ei kasutata primaarseid roti hepatotsüüte, töödeldakse uuritava ainega nii ilma kui ka koos eksogeense metaboolse aktivatsioonisüsteemiga. PDS-i võib mõõta ka *in vivo* süsteemides.

1.5. Kvaliteedikriteeriumid

Puuduvad.

1.6. Uuringumeetodi kirjeldus

Ettevalmistused

Analüüsis kasutamiseks tuleb uuritavad kemikaalid ja kontroll- või võrdlusained valmistada söötmes või suspendeerida vastavatesse lahustitesse ja seejärel lahustada söötmes. Lahuse lõppkontsentratsioon ei tohiks mõjutada rakkude eluvõimelisust.

Analüüsiks võib kasutada roti hepatotsüütide primaarkultuuri, inimese lümfotsüüte või püsiliini rakke (nt inimese diploidseid fibroblaste).

Rakke tuleb eksponeerida uuritavale kemikaalile nii vastava metaboolse aktivatsioonisüsteemi olemasolul kui ka ilma selleta.

Katsetingimused

Rakukultuuride arv

Igas eksperimendi lõigus on vajalikud vähemalt kaks rakukultuuri autoradiograafia jaoks ja kuus kultuuri (või vähem, kui see on teaduslikult põhjendatud) VSL-i abil PDS-i määramise jaoks.

Negatiivsete ja positiivsete kontrollide kasutamine

Igasse eksperimenti peaks olema kaasatud sobiv positiivne ja negatiivne (töötlemata ja/või lahusti) kontroll nii aktivatsioonisüsteemi olemasolu korral kui ka ilma selleta.

Positiivseteks kontrollideks roti hepatotsüütide analüüsil võivad olla näiteks kas 7,12-dimetüülbensatratseen (7,12-DMBA) või 2-atsetüülaminofluoreen (2-AAF). Püsiliini rakkude puhul võib 4-nitrokinoliin-N-oksiid (4-NQO) olla positiivseks kontrolliks nii autoradiograafia kui VSL-i analüüsi puhul, mis viiakse läbi ilma metaboolse aktivatsioonita; N-dimetüülnitroosamiin on positiivse kontrolli näiteks sel juhul, kui kasutatakse metaboolset aktivatsioonisüsteemi.

Kasutatavad kontsentratsioonid

Kasutada tuleb uuritava aine palju erinevaid kontsentratsioone piirides, mis võimaldaksid välja selgitada selle aine toime. Kõige kõrgem kontsentratsioon peaks esile kutsuma mõningaid tsütotoksilisi toimeid. Vees suhteliselt halvasti lahustuvaid ühendeid tuleks uurida kuni nende veeslahustuvuse piirini. Vabalt vees lahustuvate mittetoksiliste kemikaalide ülemine testitav piirikontsentratsioon tuleb määrata igal üksikjuhul eraldi.

Rakud

Säilituskultuurides tuleb kasutada sobivat söödet, CO_2 kontsentratsiooni ja temperatuuri. Püsiliini rakke tuleb perioodiliselt kontrollida mükoplasmaga kontamineerituse suhtes.

Metaboolne aktiveerimine

Metaboolse aktivatsiooni süsteemi ei kasutata hepatotsüütide primaarkultuuris. Püsiliini rakkude ja lümfotsüütide puhul eksponeeritakse neid uuritavale ainele nii vastava metaboolse aktivatsiooni süsteemi olemasolu korral kui ka selle puudumisel.

Protseduur

Rakukultuuride valmistamine

Püsiliini rakud saadakse tüvikultuurist (nt selle trüpsiniseerimisel või lahtiraputamisel), külvatakse kultiveerimisnõusse vastaval tihedusel ja inkubeeritakse +37 °C juures.

Roti hepatotsüütide lühiajalised kultuurid saadakse, kui värskelt üksteisest eraldatud hepatotsüütidel lastakse vastavas söötmes kinnituda kasvupinnasele.

Inimese lümfotsüütide kultuurid valmistatakse selleks ettenähtud viisil.

Rakukultuuride töötlemine uuritavate ainetega

Primaarsed roti hepatotsüüdid

Värskelt isoleeritud roti hepatotsüüte töödeldakse uuritava ainega ettenähtud aja jooksul radioaktiivset tümiini sisaldavas söötmes. Töötluse lõpus eemaldatakse rakkudelt sööde, nad loputatakse, fikseeritakse ja kuivatatakse. Alusklaasid kastetakse kiirgustundlikku vedelasse emulsiooni (alternatiivselt võib kasutada kile-emulsiooni), eksponeeritakse, ilmutatakse, värvitakse ja loendatakse.

Püsiliini rakud ja lümfotsüüdid

Autoradiograafilised tehnikad: pärast töötlemist ^{3}H-TdR-ga allutatakse rakukultuurid ettenähtud ajaks uuritava aine toimele. Toimeaja kestus sõltub aine omadustest, metaboolsete süsteemide aktiivsusest ja rakutüübist. Et kindlaks määrata PDS-i maksimaaltulemust, tuleks ^{3}H-TdR-i lisada kas samaaegselt uuritava ainega või mõne minuti jooksul pärast kokkupuudet uuritava ainega. Protseduuri valikut mõjutab võimalik koosmõju uuritava aine ja ^{3}H-TdR-i vahel. Selleks, et eristada PDS-i semikonservatiivsest DNA replikatsioonist, võib viimase inhibeerida näiteks kas arginiin-defitsiitset söödet, madala seerumisisaldusega või hüdroksüüreat sisaldavat rakukultuuri söödet kasutades.

PDS-i mõõtmine VSL-i abil: Enne uuritava ainega töötlemist tuleb blokeerida rakkude sisenemine S-faasi, nagu ülalpool kirjeldatud; seejärel tuleb rakke eksponeerida testitavale kemikaalile nagu autoradiograafia puhul. Inkubatsiooniaja lõpus tuleb DNA rakkudest eraldada ja määrata kogu DNA hulk ning ^{3}H-TdR-ga liitumise ulatus.

Tuleb märkida, et kui ülalkirjeldatud meetodi puhul kasutatakse inimese lümfotsüüte, siis ei ole stimuleerimata kultuurides semi-konservatiivse DNA replikatsiooni mahasurumine vajalik.

Analüüs

Autoradiograafilised määramised

PDS-i määramisel rakukultuuris S-faasis olevaid rakutuumi ei loendata. Iga erineva kontsentratsiooni kohta tuleb loendada vähemalt 50 rakku. Alusklaasid tuleb enne loendamist kodeerida. Igal alusklaasil tuleb loendada mitu eraldi asetsevat juhuslikult valitud välja. Seondunud ^{3}H-TdR-i kogus tsütoplasmas tuleb määrata loendades igas loendatava raku tsütoplasmas kolm rakutuuma suurust ala.

VSL määramised

VSL PDS määramisel tuleb kasutada iga erineva kontsentratsiooni ja kontrolli puhul adekvaatset kultuuride arvu.

Kõiki andmeid tuleb kinnitada sõltumatu katsega.

2. **ANDMED**

Andmed tuleb esitada tabelina.

2.1. **Autoradiograafilised määramised**

^{3}H-TdR-i tsütoplasmasse seondumise ulatus ja rakutuumalt leitud hõbedaterade arv tuleb eraldi registreerida.

^{3}H-TdR-i tsütoplasmaga seondumuse ulatuse ja tuuma kohta tuleva hõbedaterade arvu kirjeldamiseks võib kasutada keskmist näitajat, mediaani ja moodväärtust.

2.2. **VSL-i määramised**

VSL-i määramisteks tuleb ^{3}H-TdR-i seondumist väljendada kui dpm/µg DNA. Seondumise jaotuse kirjeldamiseks võib kasutada näitajat keskmine dpm/µg DNA koos standardhälbega.

Andmeid tuleb hinnata vastavaid statistilisi meetodeid kasutades.

3. **ARUANNE**

3.1. **Uuringu raport**

Uuringu raport peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

— kasutatud rakud, tihedus ja külvi number töötluse ajal, rakukultuuride arv,

— rakukultuuride säilitamiseks kasutatud meetodid, sealhulgas rakkude sööde, temperatuur ja CO_2 kontsentratsioon,

— uuritav aine, lahusti, kontsentratsioonid ja analüüsiks kasutatud kontsentratsioonide valiku põhjendus,

— metaboolsete aktivatsioonisüsteemide detailid,

— töötluste kava,

— positiivsed ja negatiivsed kontrollid,

— kasutatud autoradiograafilised meetodid,
— rakkude S-faasi mineku blokeerimiseks kasutatud meetodid,
— DNA eraldamiseks ja DNA koguhulga määramiseks VSL-ga kasutatud tehnikad,
— kus võimalik, anda doos/vastus suhe,
— statistiline hinnang,
— tulemuste arutelu,
— tulemuste interpreteerimine.

3.2. **Hinnang ja interpretatsioon**

Vt üldtutvustus B osa.

4. **VIITED**

Vt üldtutvustus B osa.

ÕDEKROMATIIDI VAHETUSE *IN VITRO* ANALÜÜS

1. MEETOD

1.1. Sissejuhatus

Vt üldtutvustus B osa.

1.2. Definitsioon

Vt üldtutvustus B osa.

1.3. Võrdlusained

Puuduvad.

1.4. Uuringumeetodi põhimõte

Õdekromatiidi vahetuse (ÕKV) analüüs on lühiajaline test retsiprooksete DNA vahetuste kindlakstegemiseks kahe õdekromatiidi vahel duplitseeruvas kromosoomis. ÕKV väljendab DNA replikatsiooniproduktide väljavahetamist ilmselt homoloogsetes lookustes. Eeldatavasti sisaldab see vahetusprotsess DNA ahela lõhkumist ja uuesti ühendamist, ehkki tema molekulaarsest olemusest on vähe teada. ÕKV määramine nõuab õdekromatiidide erinevat märgistamist, mida võib teostada bromodeoksüuridiini (BrdU) sisestamisega kromosomaalsesse DNA-sse kahes rakutsüklis.

Imetajate rakud eksponeeritakse testitavale kemikaalile nii koos imetajate eksogeense metaboolse aktivatsioonisüsteemiga kui ka ilma selleta ja kultiveeritakse kahe replikatsiooni vältel BrdU-d sisaldavas meediumis. Peale töötlust spindel-inhibiitoriga (nt kolhitsiin), et akumuleerida rakke mitoosi metafaasi staadiumis (c-metafaasis), rakud külvatakse ja kromosoomid prepareeritakse.

1.5. Kvaliteedikriteeriumid

Puuduvad.

1.6. Uuringumeetodi kirjeldus

Ettevalmistused

— Selles analüüsis võib kasutada primaarkultuure (inimese lümfotsüüte) või püsiliini rakke (nt hiina hamstri munasarja rakke). Püsiliini rakukultuure tuleb kontrollida mükoplasmaga kontamineerumise suhtes.

— Kasutada sobivat söödet ja inkubeerimise tingimusi (nt temperatuur, kultiveerimisnõud, CO_2 kontsentratsioon ja niiskus).

— Uuritavad ained võib ette valmistada söötmes või suspendeerida nad vastavatesse lahustitesse enne rakkude töötlemist. Lahusti lõppkontsentratsioon rakukultuuris ei tohiks oluliselt mõjutada rakkude eluvõimelisust ega kasvukiirust ja tema mõju ÕKV sagedusele tuleb jälgida lahustiga kontrollis.

— Rakke tuleb eksponeerida uuritavale ainele nii eksogeense imetajate metaboolse aktivatsioonisüsteemi olemasolu kui selle puudumise korral. Kui kasutatakse sisemist metaboolset aktiivsust omavaid rakutüüpe, peab selle aktiivsuse kiirus ja olemus olema vastavuses testitava kemikaalide klassi omadustega.

Katsetingimused

Rakukultuuride arv

Igas eksperimendi lõigus tuleb kasutada vähemalt kahte kultuuri.

Negatiivsete ja positiivsete kontrollide kasutamine

Positiivseid kontrolle peab kaasama igasse katsesse, kasutades nii otseselt toimivat ühendit kui metaboolset aktiveerimist vajavat ühendit ja samuti tuleb kontrollina kasutada lahustit.

Järgnevalt on näitena ära toodud ained, mida võiks kasutada positiivsete kontrollidena:

— otseselt toimiv ühend:

  — etüülmetaansulfonaat,

— kaudselt toimiv ühend:

  — tsüklofosfamiid.

Sobivuse korral võib kasutada ka täiendavat positiivset kontrolli samast kemikaalide klassist, kust pärineb uuritav kemikaal.

Testimiseks kasutatavad kontsentratsioonid

Tuleks kasutada vähemalt kolme erinevat uuritava aine kontsentratsiooni. Kõige suurem kontsentratsioon peaks esile kutsuma olulise toksilise efekti, võimaldades samaaegselt rakkudel siiski normaalselt jaguneda. Vees suhteliselt halvasti lahustuvaid aineid tuleks testida kuni lahustuvuse piirini, kasutades selleks sobivaid protseduure rakendades. Vabalt vees lahustuvate mittetoksiliste kemikaalide ülemine testitav piirikontsentratsioon tuleb määrata igal üksikjuhul eraldi.

Protseduur

Rakukultuuride valmistamine

Püsiliini rakud saadakse tüvikultuurist (nt selle trüpsiniseerimisel või lahtiraputamisel), külvatakse kultiveerimisnõusse vastaval tihedusel ja inkubeeritakse 37 °C juures. Ühekihiliste rakukultuuride saamiseks peab olema rakkude arv kultiveerimisnõus viidud vastavusse nii, et kultuuride konfluentsus ei oleks külvamise ajal üle 50 %. Teiseks võimaluseks on rakkude kasvatamine suspensioonis. Inimese lümfotsüütide kultuurid valmistatakse hepariniseeritud verest vastavat tehnikat kasutades ja inkubeeritakse 37 °C juures.

Töötlemine

Eksponentsiaalse kasvu faasis olevaid rakke töödeldakse ettenähtud aja jooksul uuritava ainega. Enamusel juhtudest võib 1–2 tundi olla piisav, kuid teatud juhtudel võib töötluse aeg ulatuda kuni kahe täieliku rakutsüklini. Rakud, millel puudub metaboolne aktiivsus, tuleb allutada testitavate kemikaalide toimele, tehes seda nii vastava metaboolse aktivatsioonisüsteemi olemasolu korral kui ka selle puudumisel. Kokkupuuteaja lõpus pestakse rakud uuritavast ainest puhtaks ja kultiveeritakse BrdU juuresolekul kahe replikatsioonitsükli ajaks. Teiseks võimaluseks on rakkude samaaegne kokkupuude uuritava aine ja BrdU-ga kahe rakutsükli vältel.

Inimese lümfotsüütide kultuure töödeldakse semisünkroonse seisundi ajal.

Rakke analüüsitakse peale töötlust aset leidva teise jagunemise ajal, tagades nii kõige tundlikumate rakutsükli staadiumide eksponeerituse kemikaalile. Kõiki kultuure, kuhu on lisatud BrdU, tuleb käsitseda pimedas või hämaras hõõglambi valguses kuni rakkude külvamiseni, et viia miinimumini BrdU-d sisaldava DNA fotolüüs.

Rakkude külvamine

Üks kuni neli tundi enne külvamist töödeldakse rakukultuure spindel-inhibiitoriga (nt kolhitsiin). Iga kultuur külvatakse ja töödeldakse kromosoomide prepareerimiseks eraldi.

Kromosoomide prepareerimine ja värvimine

Kromosoomide prepareerimiseks kasutatakse standardseid tsütogeneetilisi meetodeid. Preparaate võib ÕKV näitamiseks värvida mitmel meetodil (nt fluorestsents pluss Giemsa meetod).

Analüüs

Analüüsitavate rakkude arv peab põhinema ÕKV spontaanse kontrolli sagedusel. Tavaliselt analüüsitakse ÕKV kindlakstegemiseks vähemalt 25 hästi väljakujunenud metafaasi kultuuri kohta. Alusklaasid kodeeritakse enne analüüsi. Inimese lümfotsüütide puhul analüüsitakse vaid 46 tsentromeeri sisaldavaid metafaase. Püsiliini rakkude puhul analüüsitakse modaalarvust ainult ±2 tsentromeeri sisaldavaid metafaase. Tuleb ära näidata, kas tsentromeerse märgistuse lülitumist loetakse ÕKV-ks või ei. Tulemusi tuleb kinnitada sõltumatu katsega.

2. **ANDMED**

Andmed tuleb esitada tabelina. ÕKV-de arv iga metafaasi kohta ja ÕKV-de arv kromosoomi kohta igas metafaasis tuleb märkida eraldi kõigi töödeldud ja kontroll-kultuuride kohta.

Andmeid tuleb hinnata vastavate statistiliste meetoditega.

3. **ARUANNE**

3.1. **Uuringu raport**

Uuringu raport peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

— kasutatud rakud, rakukultuuride säilitamise meetodid,

— katsetingimused: söötme koostis, CO_2 kontsentratsioon, uuritava aine kontsentratsioon, kasutatud lahusti, inkubeerimise temperatuur, töötluse aeg, kasutatud tuumakäävi inhibiitor, selle kontsentratsioon ja sellega töötlemise kestus, kasutatud imetajate aktivatsioonisüsteemi tüüp, positiivsed ja negatiivsed kontrollid,

— rakukultuuride arv igas katse lõigus,

— mikroskopeeritavate preparaatide valmistamise tehnika üksikasjad,

— analüüsitud metafaaside arv (andmed iga kultuuri kohta eraldi),

— keskmine ÕKV arv raku ja kromosoomi kohta (andmed iga kultuuri kohta eraldi),

— kriteeriumid ÕKV hindamiseks,

— annuste valiku põhjendus,

— võimaluse korral anda annuse-vastusreaktsiooni suhe,

— statistiline analüüs,

— tulemuste arutelu,

— tulemuste interpreteerimine.

3.2. **Hinnang ja interpretatsioon**

Vt üldtutvustus B osa.

4. **VIITED**

Vt üldtutvustus B osa.

SUGULIITELISE RETSESSIIVSE LETAALSUSE TEST ÄÄDIKAKÄRBSEL *DROSOPHILA MELANOGASTER*

1. **MEETOD**

1.1. **Sissejuhatus**

Vt üldtutvustus B osa.

1.2. **Definitsioon**

Vt üldtutvustus B osa.

1.3. **Võrdlusained**

Puuduvad.

1.4. **Uuringumeetodi põhimõte**

Suguliitelise retsessiivse letaalsuse (SLRL) test äädikakärbsel *Drosophila melanogaster* teeb kindlaks nii punktmutatsioonide kui väikeste deletsioonide esinemise putuka idurakkudes. See test kujutab endast otsemutatsioonide analüüsi, skriinides mutatsioone ligi kaheksasajas X-kromosoomi lookuses; esindades kuni 80 % kõikidest X-kromosoomi lookustest. X-kromosoom esindab ligikaudu ühte viiendikku tervest haploidsest genoomist.

X-kromosoomi mutatsioonid väljenduvad fenotüüpselt *Drosophila melanogaster* isasel, kes kannab mutantset geeni. Kui mutatsioon on hemisügootses olekus letaalne, siis tema esinemine järeldub ühe klassi isaste järglaskonna puudumisest kahe asemel, mida tavaliselt produtseerib heterosügootne emane. SLRL test võimaldab neid fakte tuvastada spetsiaalselt markeeritud ja korraldatud kromosoomide abil.

1.5. **Kvaliteedikriteeriumid**

Puuduvad.

1.6. **Uuringumeetodi kirjeldus**

Ettevalmistused

Kärbseliinid

Võib kasutada isaseid hästi eristatavast metsiktüübist ja Muller-5 liini emaseid. Samuti võib kasutada teiste liinide vastavalt markeeritud emaseid, kellel esinevad mitmekordselt inverteerunud X-kromosoomid.

Uuritav aine

Uuritavad ained tuleb vees lahustada. Vees mittelahustuvaid aineid võib lahustada või suspendeerida vastavates lahustites (nt etanooli ja Tween-60 või 80 segus) ning vahetult enne kasutamist lahustatakse nad vees või soolalahuses. Lahustina ei tohi kasutada dimetüülsulfoksiidi (DMSO).

Loomade arv

Test tuleb planeerida ettemääratud tundlikkuse ja võimsusega. Spontaansete mutatsioonide sagedus vastaval kontrollil mõjutab tugevalt töödeldavate ja analüüsimisele kuuluvate kromosoomide arvu.

Manustamisviis

Aineid võib loomadele manustada kas suukaudselt, süstevedelikuga või eksponeerides neid selle aine gaasidele või aurudele. Testitavat ainel võib kärbestele sisse sööta koos suhkrulahusega. Vajaduse korral võib uuritavad ained lahustada 0,7 % NaCl lahuses ja süstida rindmikku või tagakehasse.

Negatiivsete ja positiivsete kontrollide kasutamine

Kasutada negatiivseid (lahusti) ja positiivseid kontrolle. Kui on aga olemas vastavad eelnevad laboratoorsed andmed kontrollide kohta, ei ole samaaegseid kontrolle vaja.

Ekspositsiooni tasemed

Kasutada kolme ekspositsiooni taset. Uuritava aine esialgseks hindamiseks võib kasutada ühte ekspositsiooni taset, mis oleks kas maksimaalne talutav kontsentratsioon või mis tekitaks juba mõningast toksilisust. Mittetoksiliste ainete puhul tuleks kasutada praktikas kasutatavat maksimaalset kontsentratsiooni.

Protseduur

Metsiktüüpi isaseid (kolm kuni viis päeva vanad) töödeldakse uuritava ainega ja paaritatakse individuaalselt liias olevate eelnevalt paaritamata Muller-5 liini või mõne muu vastavalt markeeritud (mitmekordselt inverteeritud X-kromosoomidega) liini emastega. Paaritatud emased asendatakse noorte veel paaritamata emastega iga kahe kuni kolme päeva järel, et kogu idurakkude tsükkel saaks kaetud. Nende emaste järglaskonna põhjal hinnatakse letaalseid efekte, mis vastavad küpsete spermatosoidide mõjutamisele, keskmise või lõpustaadiumi spermatiidide mõjutamisele, noorte spermatiidide, spermatotsüütide ja spermatogoonia mõjutamisele uuritava ainega.

Ülalkirjeldatud ristamistest saadud heterosügootseid F_1 emaseid lastakse individuaalselt paarituda (s.o üks emane viaali kohta) oma vendadega. F_2 generatsioonis hinnatakse igat kultuuri metsiktüübi isaste puudumise alusel. Kui kultuur on tekkinud F_1 emasest, kes omas vanematelt saadud letaalsust kandvat X-kromosoomi (s.o töödeldud kromosoomiga isased isendid puuduvad), tuleb selle emase sama genotüübiga tütreid testida, et teha kindlaks, kas letaalsus kordub järgmises generatsioonis.

2. ANDMED

Andmed esitatakse tabelina, et näidata testitud X-kromosoomide arv, mittefertiilsete isaste arv ja letaalsete kromosoomide arv iga testitud aine kontsentratsiooni kohta ja iga töödeldud isase iga paaritusperioodi kohta. Raportis tuleb ära tuua ühe isase kohta esinevate erineva suurusega klasterite arv. Neid andmeid tuleb kinnitada sõltumatu eksperimendiga.

Suguliitelise retsessiivse letaalsuse testide hindamiseks tuleb kasutada vastavaid statistilisi meetodeid. Arvesse tuleb võtta ühelt isaselt pärinevate retsessiivsete letaalide klastrite moodustumist ja hinnata seda vastava statistilise meetodiga.

3. ARUANNE

3.1. Uuringu raport

Uuringu raport peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

— liin: *Drosophila* kasutatud tüved või liinid, putukate vanus, töödeldud isaste arv, steriilsete isaste arv, saadud F_2 kultuuride arv, ilma järglaskonnata F_2 kultuuride arv, letaalset geeni kandvate kromosoomide arv, mis määratakse igas idurakkude staadiumis,

— töödeldud gruppide suuruse kindlaksmääramise kriteeriumid,

— katsetingimused: üksikasjalik töötluste ja katseplaani kirjeldus, ekspositsiooni tasemed, toksilisuse andmed, vajaduse korral negatiivne (lahusti) ja positiivne kontroll,

— letaalsete mutatsioonide hindamiskriteeriumid,

— kus võimalik, esitada ekspositsiooni/toime suhe,

— andmete hindamine,

— tulemuste arutelu,

— tulemuste interpretatsioon.

3.2. Hinnang ja interpretatsioon

Vt üldtutvustus B osa.

4. VIITED

Vt üldtutvustus B osa.

IMETAJARAKU TRANSFORMATSIOONITESTID *IN VITRO*

1. MEETOD

1.1. Sissejuhatus

Vt üldtutvustus B osa.

1.2. Definitsioon

Vt üldtutvustus B osa.

1.3. Võrdlusained

Puuduvad.

1.4. Uuringumeetodi põhimõte

Imetajarakukultuure on võimalik *in vitro* kasutada keemiliste mutageenide poolt indutseeritud fenotüübiliste muutuste avastamiseks. Neid mutageene seostatakse maliigse transformatsiooni tekkega *in vivo*. Laialt kasutatavateks rakkudeks on C3H10T½, 3T3, SHE ja Fischeri roti rakuliinid. Testid põhinevad rakumorfoloogia muutuste, fookuse moodustumise või agaroosgeelidel rakkude pesastumise muutuste avastamisel. Harvem teostatakse uuringuid, mis avastavad kartsinogeensetele kemikaalidele eksponeeritud rakkudel teisi morfoloogilisi või füsioloogilisi muutuseid. Ükski *in vitro* testi tulemusnäitaja ei ole kinnitanud ühegi mehhanismi konkreetset süstemaatilist seost kasvajatega. Osad testsüsteemid on võimelised kindlaks tegema kasvajate promootoreid. Uuritavate ainete tsütotoksilisuse astet saab määrata, kui mõõta aine toimet pesasid moodustavatele ühikutele (kloonide produktsiooni efektiivsusele) ja rakukultuuride kasvukiirusele. Tsütotoksilisuse määramine on oluline tõestamaks, et testitav kemikaal avaldab toksilist toimet rakkudele, vaatamata sellele, et rakkude maliigse transformatsiooni sagedust ei ole alati võimalik mõõta. Põhjuseks on osades katsetes kasutatav pikem inkubatsiooniaeg ja/või ümber külvamine teisele alusele.

1.5. Kvaliteedikriteeriumid

Puuduvad.

1.6. Uuringumeetodi kirjeldus

Ettevalmistused

Rakud

Läbiviidavast transformatsioonitestist sõltuvalt on võimalik kasutada erinevaid rakuliine või tüvirakke. Katse läbiviija peab olema kindel, et testis kasutatavad rakud teevad läbi vajaliku fenotüüpse muutuse pärast kokkupuudet tuntud kartsinogeenidega. Samuti peab katse läbiviija tagama optimaalsed laboritingimused ning dokumenteeritud tõestuse, et uuring on kehtiv ja usaldusväärne.

Keskkond

Transformatsiooni analüüsi läbiviimise keskkond ja katsetingimused peavad vastama vajadustele.

Uuritav aine

Uuritavad ained võib valmistada kultiveerimiskeskkonnas või lahustada või suspendeerida vastavates lahustis enne rakkude töötlemist. Lahusti lõppkontsentratsioon kultiveerimiskeskkonnas ei tohi mõjutada rakkude elulemust ega kasvukiirust.

Metaboolne aktivatsioon

Rakud peaksid olema eksponeeritud uuritavale ainele nii imetaja metaboolse aktivatsioonisüsteemi olemasolul kui ka selle puudumisel. Kui kasutatakse sisemist metaboolset aktiivsust omavaid rakutüüpe, peab tegema kindlaks, et rakkude metabolismi kiirus ja aktiivsuse iseloom vastavad tingimustele.

Katsetingimused

Positiivsete ja negatiivsete kontrollide kasutamine

Igas eksperimendis peab rakendama positiivset kontrolli rakkudele otsest mõju avaldava ühendiga ja ka ühendiga, mille toime avaldumiseks on vajalik metaboolse aktiivsuse olemasolu. Samuti on vajalik negatiivne kontroll (lahusti).

Positiivsete kontrollidena võib kasutada:

— otsest toimet avaldavad ühendid:

  — etüülmetaansulfonaat,

  — propiolaktoon,

— kaudse toimega ühendid:

  — 2-atsetüülaminofluoreen,

  — 4-dimetüülaminoasobenseen,

  — DMBA (7,12-dimetüülbensantratseen).

Kui võimalik, võib kasutada positiivse kontrollina uuritava ühendiga samasse keemilisse klassi kuuluvat ainet.

Kasutatavad kontsentratsioonid

Testis tuleb kasutada erineva uuritava aine kontsentratsiooniga lahuseid. Eesmärgiks on teha kindlaks kontsentratsioonist sõltuv toksiline efekt. Efekti olemasolul peaks kõrge uuritava aine kontsentratsiooniga lahuse toime järel rakkude elulemus langema ning väikese kontsentratsiooniga lahuse toime järel peaks rakkude elulemus olema ligikaudu sama, mis negatiivses kontroll-lahuses. Vees suhteliselt halvasti lahustuvaid aineid tuleks vastavate meetodite abil uurida lahustuvuse piirini. Täielikult veeslahustuvatele mittetoksilistele ainetele tuleb maksimaalne kontsentratsioonimäär valida vastavalt iga katse vajadusele.

Protseduur

Rakud peavad toksilisele substantsile olema eksponeeritud sobiva aja vältel, mis oleneb kasutatud testisüsteemist. Kui kokkupuuteaega pikendatakse, võib olla vajalik aine uuesti lisamine koos keskkonna vahetamisega (ja vajadusel värske, metaboolselt aktiivse lahuse lisamine). Piisava sisemise metaboolse aktiivsuseta rakud peavad uuritava ainega kokku puutuma nii sobiva metaboolset aktivatsiooni esilekutsuva süsteemi olemasolul kui ka puudumisel. Kokkupuuteaja lõppemisel pestakse rakud uuritavast ainest puhtaks ning külvatakse tingimustel, mis sobivad uuritava fenotüübi muutuse ilmnemiseks ja transformatsioonide arvu määramiseks. Kõik tulemused tõestatakse sõltumatu uuringuga.

2. ANDMED

Andmed tuleks esitada tabelina, mis võib olla erinev, sõltuvalt kasutatud testist (kasutatud alusklaaside arv, positiivse tulemusega alusklaaside arv, mutatsioonidega rakkude arv). Võimaluse korral tuleks esitada mutatsioonisagedus muteerunud rakkude arvu ja eluvõimeliste rakkude arvu suhtena. Eluvõimelisuse määr ja kloonide produtseerimismäär esitatakse protsendina kontrollmäärast. Andmete analüüsi peab teostama sobivate statistiliste meetodite abil.

3. ARUANNE

3.1. Uuringu raport

Uuringu raport peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

— kasutatud rakuliin, rakukultuuride arv, rakukultuuride säilitusmeetodid,

— katsetingimused: uuritava aine kontsentratsioon, kasutatud lahusti, inkubatsiooni aeg, rakutihedus töötlemise ajal, imetaja metaboolset aktiivsust omava süsteemi tüüp, positiivsed ja negatiivsed kontrollid, jälgitud fenotüüpide kirjeldus, kasutatud selektiivsed ained (kui on asjakohane), annuste valiku põhimõte,

— eluvõimeliste ja mutantsete rakkude loendamismeetod,
— statistiline hindamine,
— tulemuste arutelu,
— tulemuste interpretatsioon.

3.2. **Hinnang ja interpretatsioon**

Vt üldtutvustus B osa.

4. **VIITED**

Vt üldtutvustus B osa.

NÄRILISTE DOMINANTSE LETAALSUSE TEST

1. **MEETOD**

1.1. **Sissejuhatus**

Vt üldtutvustus B osa.

1.2. **Definitsioon**

Vt üldtutvustus B osa.

1.3. **Võrdlusained**

Puuduvad.

1.4. **Uuringumeetodi põhimõte**

Dominantsed letaalsed toimed põhjustavad loote surma. Dominantsete letaalide indutseerimine keemiliste ainetega töötlemisel näitab, et see aine on mõjutanud uuritava liigi lootekudet. Üldiselt aktsepteeritakse, et dominantne letaalsus tekib kromosoomide kahjustumise tõttu (struktuurilised ja arvulised anomaaliad). Loodete suremine ravitud emasloomal võib olla ka toksilise mõju tulemuseks.

Üldiselt eksponeeritakse uuritavale ainele isasloomi ning neid paaritatakse ravimata ja seni paaritamata emastega. Erinevaid iduraku staadiume võib testida eraldi, kasutades järjestikuseid paarituste intervalle. Ühe emase kohta tulevate surnud implanteerunud loodete arvu suurenemine töödeldud grupis võrrelduna surnud implantaatide arvuga kontrollgrupi emastel peegeldab implantatsioonijärgset loodete surma. Enne implantatsiooni toimunud loodete hävimist saab hinnata kollaskehade (*corpora lutea*) arvu järgi või võrreldes ühe emase kohta tulevat implantaatide koguarvu ravi saanute ja kontrollgrupis. Dominantne letaalne üldtoime on implantatsioonieelsete ja -järgsete kadude summa. Dominantse letaalse üldtoime arvutamine põhineb ravi saanute grupis ühe emase kohta tulevate elusate implantaatide arvu võrdlemisel kontrollgrupi sama näitajaga. Implantaatide arvu vähenemine teatud ajavahemikes võib olla rakkude hävimise tulemuseks (s.o kas spermatotsüütide ja/või spermatogoonia).

1.5. **Kvaliteedikriteeriumid**

Puuduvad.

1.6. **Uuringumeetodi kirjeldus**

Ettevalmistused

Kui võimalik, tuleb uuritavad ained lahustada või suspendeerida isotoonilises soolalahuses. Vees mittelahustuvad ained võib lahustada või suspendeerida vastavates lahustites. Kasutatav lahusti ei tohi omada koostoimeid uuritava kemikaaliga ega avaldada tokilist mõju. Uuritav kemikaal tuleb ette valmistada vahetult enne kasutamist.

Katsetingimused

Manustamisviis

Testitavat ühendit tuleb üldjuhul manustada ainult üks kord. Vajadusel võib rakendada korduvaid manustamisi, olenevalt toksikoloogilisest informatsioonist. Tavalisteks manustamisviisideks on suukaudselt sondi teel või intraperitoneaalne süstimine. Võivad sobida ka teistsugused manustamisviisid.

Katseloomad

Soovitatavateks loomaliikideks on rotid ja hiired. Terved täielikult suguküpsed loomad jagatakse juhuslikkuse alusel töötlemisele kuuluva ja kontrollgrupi vahel ära.

Arv ja sugu

Uuritava aine manustamiseks tuleb kasutada piisavat arvu isaseid loomi, võttes arvesse hinnatava bioloogilise tunnuse iseeneslikku varieerumist. Loomade arvu valik peaks põhinema eelnevalt kindlaks tehtud määramise tundlikkusel ja olulisuse määral. Näiteks ühes tüüpilises testis peaks olema isaste arv igas erineva annusega ravitavas grupis piisav, et saada 30–50 tiinet emaslooma ühe paaritusintervalli kohta.

Negatiivsete ja positiivsete kontrollide kasutamine

Tavaliselt peavad igas eksperimendis olema samaaegselt nii positiivsed kui ka negatiivsed (lahusti) kontrollid. Kui samas laboratooriumis on olemas hiljuti läbi viidud katse positiivse kontrolli aktsepteeritavad tulemused, siis võib kasutada neid tulemusi positiivse kontrolli katsesse lülitamise asemel. Positiivseid kontrollaineid tuleb kasutada vastavas madalas annuses (nt MMS, intraperitoneaalselt annuses 10 mg/kg), et näidata testi sensitiivsust.

Annused

Tavaliselt tuleb kasutada kolme annust. Kõrge annus peaks avaldama toksilist toimet või vähendama uuritavat ainet saanud loomade viljakust. Teatud juhtudel võib olla piisav ühe suure annuse kasutamine.

Piirtest

Mittetoksilisi aineid tuleb testida annuses 5 g/kg ühekordsel manustamisel või 1 g/kg päevas korduval manustamisel.

Protseduur

Kasutusel on mitmesugused uuritava aine manustamise skeemid. Kõige enam kasutatakse uuritava aine ühekordset manustamist. Võib kasutada ka teisi skeeme.

Ühte isaslooma paaritatakse manustamisjärgselt ettenähtud aja möödudes järgemööda ühe või kahe ainet mittesaanud ja paaritamata emasega. Emased tuleb jätta isastega kokku vähemalt ühe östraaltsükli ajaks või seniks, kuni paaritumine on toimunud. Seda hinnatakse sperma leidumise alusel tupes või vaginaalkorgi olemasolu järgi.

Aine manustamise järgsete paarituste arvu määrab manustamise ajaline skeem, mis peab võimaldama kõigi idurakustaadiumide mõjutamise uurimist.

Emased lahatakse tiinuse teisel poolel ja emaka sisaldist uuritakse surnud ja elusate implanteerunud loodete arvu kindlakstegemiseks. Munasarju võib uurida kollaskehade arvu kindlakstegemiseks.

2. **ANDMED**

Andmed tuleb esitada tabelina, näidates isaste arvu, tiinete ja mittetiinete emaste arvu. Iga paarituse tulemused tuleb esitada individuaalselt iga isase ja emase kohta eraldi. Iga emase kohta tuleb näidata paarituse nädal, isasele manustatud annus, elusate ja surnud loodete esinemine.

Dominantse letaalsuse kogutoime arvutatakse välja, võrreldes omavahel elusate implantaatide arvu ühe emase kohta testgrupis elusate implantaatide arvuga ühe emase kohta kontrollgrupis. Saadud andmeid – surnud loodete suhe elusatesse ainet saanute grupis võrrelduna sama suhtega kontrollgrupis – analüüsitakse implantatsioonijärgset loodete hävimise näitamiseks.

Kui andmed pannakse kirja varaste ja hiliste surmadena, peab ka see tabelites kajastuma. Kui hinnatakse implantatsioonieelset kadu, peab see olema registreeritud. Implantatsioonieelset kadu võib arvutada kui erinevust kollaskehade arvu ja implantaatide arvu vahel või kui implantaatide keskmise arvu vähenemist emaka kohta võrrelduna kontrollpaaritustega.

Andmeid hinnatakse vastavaid statistilisi meetodeid kasutades.

3. **ARUANNE**

3.1. **Uuringu raport**

Uuringu raport peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

— kasutatud loomade liik, aretusliin, vanus, kehakaal, isaste ja emaste arv testitavas ja kontrollgrupis,

— testitav aine, lahusti, testitavad annused ja annuste valiku põhjendus, negatiivsed ja positiivsed kontrollid, andmed toksilisuse kohta,

— töötlemisviis ja töötluste ajakava,

— paarituste ajakava,

— paarituse toimumise määramiseks kasutatud meetod,

— lahangu aeg,

— dominantse letaalsuse hindamise kriteeriumid,

— võimaluse korral anda annuse/vastusreaktsiooni suhe,

— statistiline analüüs,

— tulemuste arutelu,

— tulemuste interpretatsioon.

3.2. **Hinnang ja interpretatsioon**

Vt üldtutvustus B osa.

4. **VIITED**

Vt üldtutvustus B osa.

IN VIVO IMETAJATE IDURAKKUDE TSÜTOGENEETIKA

1. MEETOD

1.1. Sissejuhatus

Vt üldtutvustus B osa.

1.2. Definitsioon

Vt üldtutvustus B osa.

1.3. Võrdlusained

Puuduvad.

1.4. Uuringumeetodi põhimõte

See tsütogeneetiline *in vivo* test teeb kindlaks spermatogoonia ajal asetleidvad struktuursed kromosoomi aberratsioonid. Test koosneb spermatogoonsete mitooside analüüsidest kromatiidi ja kromosoomi aberratsioonide kindlaks tegemiseks.

Käesoleva meetodi puhul eemaldatakse testised nendelt imetajatelt, kes on ettenähtud viisil kokkupuutunud uuritava kemikaaliga ja neid lahatakse erinevate ajavahemike möödudes. Enne lahangut töödeldakse loomi tuumakäävi inhibiitoriga (näiteks kolhitsiiniga), et koguda rakke mitoosi metafaasisarnases staadiumis (c-metafaasis). Valmistatakse õhu käes kuivatatud kromosoomipreparaadid, mis värvitakse ja mikroskopeeritakse.

Kasulikku lisainformatsiooni võib saada spermatotsüütide multivalentse translokatsiooni analüüsist diakineesmetafaas I staadiumis pärast spermatogoniaalsete tüvirakkude töötlemist.

1.5. Kvaliteedikriteeriumid

Puuduvad.

1.6. Uuringumeetodi kirjeldus

Ettevalmistused

Uuritavad kemikaalid lahustatakse isotoonilises soolalahuses. Kui nad on vees lahustumatud, siis lahustatakse või suspendeeritakse nad vastavas lahustis. Kasutatakse värskelt valmistatud uuritavat ühendit sisaldavaid lahuseid. Kui lahustit kasutatakse doseerimise hõlbustamiseks, ei tohi ta avaldada koostoimet testitava kemikaaliga ega avaldada toksilist toimet.

Manustamisviis

Uuritavaid ühendeid tuleb üldjuhul manustada ainult üks kord. Uuritavat ainet võib manustada ka korduvalt, lähtudes toksikoloogilisest informatsioonist. Kuid korduvat töötlemist võib rakendada ainult siis, kui uuritav ühend ei avalda suuremat tsütotoksilist mõju spermatogooniale.

Tavalisteks manustamisviisideks on peroraalne ja intraperitoneaalne süstimine. Võivad sobida ka teised manustamisviisid.

Katseloomad

Kõige sagedamini kasutatakse hiiri ja hiina hamstreid. Võib kasutada ka mistahes teisi loomaliike.

Kasutatakse suguküpseid isaseid, kes jaotatakse juhuslikkuse alusel katse- ja kontrollgrupiks.

Loomade arv

Nii katse- kui kontrollgrupis peab olema vähemalt viis isaslooma.

Negatiivsete ja positiivsete kontrollide kasutamine

Igasse eksperimenti peavad olema kaasatud nii positiivsed kui ka negatiivsed (lahusti) kontrollid.

Positiivseid kontrollaineid tuleb kasutada vastava madala annuse juures (nt mitomütsiin C, intraperitoneaalselt annuses 0,3 mg/kg) testi tundlikkuse tõestamiseks.

Annused

Kasutatakse uuritava ühendi ühekordset annust, mis on maksimaalne talutav annus või mis avaldab mõningast tsütotoksilisust. Kui see annus põhjustab suurt rakkude suremust, tuleb kasutada täiendavalt madalamat annust tsütotoksilisuse näitamiseks. Kui on vaja kindlaks määrata annuse/vastusreaktsiooni suhe, tuleb kasutada vähemalt kolme annust (nt et tõestada nõrka positiivset vastust). Mittetoksilisi aineid tuleb testida kõige kõrgema praktikas kasutatava annusega nii ühekordse kui korduvate manustamiste puhul.

Protseduur

Harilikult manustatakse katseloomadele uuritavat ühendit ainult üks kord. Kõige suuremat annust saanute rühmas võetakse proove kolmel erineval ajal pärast manustamist. Keskmiseks proovide kogumise intervalliks on 24 tundi. Kuna uuritav ühend võib mõjutada rakutsükli kineetikat, rakendatakse ühte varasemat ja ühte hilisemat proovide kogumise intervalli, mis on vastavalt ajavahemikus 6–48 tundi. Täiendavate annuste puhul tuleb proovid võtta eriti tundlikel ajavahemikel või kui need pole teada, siis 24 tundi pärast manustamist.

Alternatiivselt võib rakendada korduvannuste skeemi ja loomad tuleb lahata 24 tundi pärast viimast annust. Võib kasutada täiendavaid proovide kogumise aegu vahemikus 6 kuni 24 tunnini.

Testiste prepareerimine

Spermatogonaalsete mitooside analüüsimiseks süstitakse loomadele intraperitoneaalselt vastav annus tuumakäävi inhibiitorit, näiteks kolhitsiini. Seejärel loomad surmatakse ettenähtud aja möödudes. Hiirte puhul ulatub see ajavahemik kolmest kuni viie tunnini, hiina hamstrite puhul võib see olla üle viie tunni.

Proovid kuivatatakse õhu käes. Erinevate liikide puhul võib osutuda vajalikuks standardsete protseduuride modifitseerimine. Saadud rakususpensioonid töödeldakse hüpotoonilise lahusega ja fikseeritakse. Rakud kantakse alusklaasile ja värvitakse. Alusklaasid kodeeritakse enne mikroskopeerimist.

Analüüs

Struktuursete kromosoomi aberratsioonide suhtes analüüsitakse vähemalt 100 hästi välja kujunenud mitootilist metafaasi, mille tsentromeeride arv on täielik. Täiendavalt võib määrata spermatogonaalsete mitooside suhte esimesse ja teise meiootilisse metafaasi sajas jagunevas rakus ühe looma kohta, et teha kindlaks võimalikku tsütotoksilist mõju.

2. **ANDMED**

Andmed tuleb esitada tabeli kujul. Iga uuritavat ainet saanud ja kontroll-looma kohta loetletakse kõik aberratsiooni liigid eraldi üles. Lisatakse analüüsitud rakkude koguarv ja aberrantsete rakkude koguarv iga grupi kohta. Kõigi näitajate jaoks antakse keskmised ja standardhälbed. Pärast määramisi kantakse tabelisse iga katse- ja kontrollgrupi kohta ka spermatogonaalsete mitooside keskmine suhe esimesse ja teise meiootilisse metafaasi.

Andmeid hinnatakse vastavaid statistilisi meetodeid rakendades.

3. **ARUANNE**

3.1. **Uuringu raport**

Uuringu raport peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

— isaste loomade liik ja aretusliin, vanus ja kehakaal,

— loomade arv igas katse- ja kontrollgrupis,

— katsetingimused, töötluste üksikasjalik kirjeldus, annused, lahustid, kasutatud tuumakäävi inhibiitor,

— igas grupis ühe looma kohta analüüsitud rakkude arv,

— iga töödeldud ja kontroll-looma kohta näidata: aberratsioonide arv ja tüüp,

— statistiline hinnang,

— tulemuste arutelu,

— tulemuste interpretatsioon.

3.2. **Hinnang ja interpretatsioon**

Vt üldtutvustus B osa.

4. **VIITED**

Vt üldtutvustus B osa.

HIIRE LAIKUDE TEST

1. **MEETOD**

1.1. **Sissejuhatus**

Vt üldtutvustus B osa.

1.2. **Definitsioon**

Vt üldtutvustus B osa.

1.3. **Võrdlusained**

Puuduvad.

1.4. **Uuringumeetodi põhimõte**

See on *in vivo* test hiirtega, kelles arenevaid embrüoid mõjutatakse kemikaalidega. Märklaudadeks arenevas embrüos on melanoblastid ja märklaudgeenideks on need, mis kontrollivad karvastiku pigmentatsiooni. Arenevad embrüod on heterosügootsed terve rea karvavärvuse geenide suhtes. Sellise geeni dominantse alleeli muteerumine või kadumine (erinevate geneetiliste sündmuste tulemusena) melanoblastis annab tulemuseks retsessiivse fenotüübi ekspressiooni tema järglasrakkudes, moodustades muutunud värvusega laigu hiire karvastikus. Tehakse kindlaks selliste laikudega – mutatsioonidega – järglaste arv ja nende sagedust võrreldakse sama näitajaga järglaskonnas, keda embrüostaadiumis töödeldi ainult lahustiga. Hiire nahalaikude test teeb kindlaks eeldatavaid somaatilisi mutatsioone loote rakkudes.

1.5. **Kvaliteedikriteeriumid**

Puuduvad.

1.6. **Uuringumeetodi kirjeldus**

Ettevalmistused

Võimaluse korral lahustatakse või suspendeeritakse uuritavad ained isotoonilises soolalahuses. Vees mittelahustuvad kemikaalid lahustatakse või suspendeeritakse vastavates lahustites. Kasutatav lahusti ei tohi omada koostoimet uuritava kemikaaliga ega avaldada toksilist toimet. Katses tuleb kasutada värskelt valmistatud kemikaali.

Katseloomad

T-liini hiiri (mitteaguuti, a/a; chinchilla, roosa silm, c^{ch} p/c^{ch}p; pruun, b/b; *dilute*, lühike kõrv, d se/d se; laiguline, s/s) paaritatakse kas HT liiniga (kahkjas, mitteaguuti, brahhüpoodne, pa a bp/pa a bp; tinajas kräsukarvaline, ln fz/ln fz; pärl pe/pe) või C57 BL liiniga (mitteaguuti, a/a). Teisi sobivaid ristamisi nagu NMRI (mitteaguuti, a/a; albiino, c/c) ja DBA (mitteaguuti, a/a; pruun, b/b; dilute d/d) vahel võib samuti kasutada, juhul kui nad annavad mitteaguutit järglaskonda.

Arv ja sugu

Uuritavat ainet manustatakse piisavale arvule tiinetele emastele, et saada vastav arv ellujäävat järglaskonda iga annuse jaoks. Vastav proovide suurus määratakse uuritavat ainet saanud hiirtel kindlaks tehtud karvalaikude arvu ja kontrollandmete põhjal. Negatiivne tulemus on ainult siis aktsepteeritav, kui hinnatud on vähemalt 300 kõige suurema annusega töödeldud emaste järglast.

Negatiivsete ja positiivsete kontrollide kasutamine

Kättesaadavad peavad olema samaaegsed kontrollandmed hiirtelt, kes said ainult vehiiklit (negatiivsed kontrollid). Samast laboratooriumist saadud varasemaid kontrollandmed võib testi tundlikkuse suurendamiseks ühendada eeldusel, et nad on homogeensed. Kasutatavad peavad olema samast laboratooriumist selle testiga hiljuti saadud positiivse kontrolli andmed teadaolevalt mutageense kemikaali kohta, kui testitava kemikaali puhul ei avastata mutageenset toimet.

Manustamisviis

Tavalisteks manustamisviisideks on suukaudne sondi teel manustamine või tiinete emaste intraperitoneaalne süstimine. Vajaduse korral kasutatakse inhalatsiooni või teisi manustamisviise.

Annused

Kasutatakse vähemalt kahte annust, millest üks neist ilmutab toksilisuse tunnuseid või põhjustab väiksemaarvulisi pesakondi. Mittetoksilise kemikaalide puhul tuleb kasutada maksimaalset praktikas kasutatavat annust.

Protseduur

Ühekordne töötlus viiakse tavaliselt läbi 8., 9. või 10. tiinuse päeval, lugedes esimeseks päeva, mil esmakordselt täheldati vaginaalkorki. Need päevad vastavad 7,25., 8,25. ja 9,25. päevale pärast viljastamist. Nendel päevadel võib rakendada järjestikusi töötlemisi.

Analüüs

Järglaskond kodeeritakse ning neid hinnatakse laikude esinemise alusel kolmanda ja neljanda nädala jooksul peale sündimist. Eristatakse kolme laikude klassi:

a) kuni 5 mm suurused valged laigud ventraalsel keskjoonel, mida peetakse rakkude surmamise tulemuseks (WMVS);

b) kollased aguutivärvi laigud, mis on seotud piimanäärmete, genitaalide, kõri, õlavarre ja kubemepiirkonnaga ning lauba keskosaga, arvatakse olevat diferentseerumishäirete (MDS) tulemuseks; ja

c) hajusalt üle keha esinevad pigmenteerunud ja valged laigud, mida peetakse somaatiliste mutatsioonide (RS) tulemuseks.

Kõik need kolm erinevat laikude klassi kuuluvad hindamisele, kuid ainult viimane neist (RS) omab geneetilist tähtsust. MDS ja RS eristamisel tekkivaid probleeme saab lahendada proovikarvade uurimisel fluorestsentsmikroskoobi abil.

Tuleb tähele panna kõiki ilmseid morfoloogilisi ebanormaalsusi järglaskonnas.

2. ANDMED

Andmed esitatakse hinnatud järglaskonna koguarvuna ja ühte või enamat eeldatavat somaatilise mutatsioonilaiku omavate järglaste arvuna. Uuritavat ainet saanud loomade ja negatiivse kontrolli andmeid võrreldakse vastavate meetodite abil. Andmed esitatakse samuti eraldi iga pesakonna kohta.

3. ARUANNE

3.1. Uuringu raport

Uuringu raport peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

— ristamiseks kasutatud liinid,

— tiinete emaste arv katse- ja kontrollgrupis,

— keskmine pesakonna suurus uuritavat ainet saanute ja kontrollgrupis sündimise ja võõrutamise ajal,

— testitava kemikaali annus(ed),

— kasutatud lahusti,

— tiinuse päev, millal töötlus läbi viidi,

— manustamisviis,

— hinnatud järglaskonna koguarv, WMVS, MDS ja RS muutusi kandvate järglaste arv eksperimentaal- ja kontrollgrupis,

— kõik morfoloogilised anomaaliad,

— võimalusel anda annuse/vastusreaktsiooni suhe RS muutuste kohta,

— statistiline analüüs,

— tulemuste arutelu,

— tulemuste interpretatsioon.

3.2. **Hinnang ja interpretatsioon**

Vt üldtutvustus B osa.

4. **VIITED**

Vt üldtutvustus B osa.

HIIRE PÄRILIK TRANSLOKATSIOON

1. MEETOD

1.1. Sissejuhatus

Vt üldtutvustus B osa.

1.2. Definitsioon

Vt üldtutvustus B osa.

1.3. Võrdlusained

Puuduvad.

1.4. Uuringumeetodi põhimõte

Hiire päriliku translokatsiooni test teeb kindlaks esimese põlvkonna järglastel kindlaks tehtud struktuursed ja arvulised muutused imetajate idurakkude kromosoomides. Kindlaks tehtud kromosomaalsed muutused on retsiprooksed translokatsioonid ja juhul kui kaasa on haaratud ka järglaskonna emasloomad, kantakse edasi X-kromosoomide kadu. Translokatsioonide kandjatel ja XO-emastel on vähenenud viljakus, mida kasutatakse F_1 järglaskonna selekteerimiseks tsütogeneetilise analüüsi jaoks. Täielikku steriilsust põhjustavad teatud kindlat tüüpi translokatsioonid (X-autosoomi ja c-t tüüp). Translokatsioone jälgitakse tsütogeneetiliselt meiootilistes rakkudes diakineesi I metafaasis isastel indiviididel, kas F isastel või F_1 emaste isastel järglastel. XO-emased identifitseeritakse tsütogeneetiliselt ainult 39 kromosoomi olemasolu põhjal luuüdi mitoosides.

1.5. Kvaliteedikriteeriumid

Puuduvad.

1.6. Uuringumeetodi kirjeldus

Ettevalmistused

Testitavad kemikaalid lahustatakse isotoonilises soolalahuses. Kui ained on vees lahustumatud, siis lahustatakse või suspendeeritakse nad vastavates lahustites. Kasutatakse värskelt valmistatud testitavate ühendite lahuseid. Kui lahustit kasutatakse annustamise lihtsustamiseks, ei tohi ta omada koostoimet testitava kemikaaliga ega mõjuda toksiliselt.

Manustamisviis

Manustamisviisideks on tavaliselt suukaudselt sondi teel või intraperitoneaalne süstimine. Sobida võivad ka teised manustamisviisid.

Katseloomad

Paarituste läbiviimise ja tsütoloogilise tõestamise lihtsustamiseks viiakse need katsed läbi hiirtega. Spetsiifiliste hiireliinide kasutamine ei ole vajalik, kuid keskmine pesakonna suurus antud liini hiirtel peaks olema suurem kui kaheksa ja see peaks olema suhteliselt konstantne. Katsesse valitakse terved suguküpsed loomad.

Loomade arv

Vajalik loomade arv sõltub spontaansete translokatsioonide sagedusest ja positiivse tulemuse saamiseks vajaliku induktsiooni minimaalsest tasemest.

Test põhineb tavaliselt F_1 järglaskonna isasloomade analüüsil. Ühes uuritavat ainet saajate grupis tuleb testida vähemalt 500 F_1 järglaskonna isast. Kui on kaasatud ka F_1 järglaskonna emased, siis tuleb testida 300 isas- ja 300 emaslooma.

Negatiivsete ja positiivsete kontrollide kasutamine

Kasutatavad peavad olema vastavad kontrollandmed, mis on saadud konkureerivate ja varem läbi viidud testide kontrollrühmade kohta. Kui on olemas aktsepteeritavad hiljuti samas laboris läbi viidud eksperimentide positiivsete kontrollide tulemused, siis võib kasutada neid andmeid ja jätta positiivsed kontrollid käesolevast testist välja.

Annused

Testitakse ühte, tavaliselt kõige suuremat annust, mis on seotud loomal minimaalsete toksiliste mõjutuste esilekutsumisega, kuid mis ei mõjuta reproduktiivset käitumist ega ellujäämist. Annuse/vastusreaktsiooni suhte kindlakstegemiseks on vaja katsesse lisada kaks madalamat annust. Mittetoksilise kemikaali puhul tuleb uurida maksimaalset praktiliselt kasutatavat annust.

Protseduur

Uuritava aine manustamine ja paaritamine

Kasutusel on kaks skeemi. Kõige laialdasemalt kasutatakse uuritava aine ühekordset manustamist. Võib kasutada ka uuritava aine manustamist seitsmel päeval nädalas 35 päeva järjest. Manustamisele järgnev paarituste arv sõltub manustamisskeemist ja peaks tagama, et proove võetaks kõigist iduraku staadiumidest. Pärast paaritusperioodi lõppu pannakse emasloomad eraldi puuridesse. Kui emasloom poegib, märgitakse üles poegimise kuupäev ja järglaste arv ning sugu. Kõik isased järeltulijad võõrutatakse ja kõik emased järeltulijad hukatakse, välja arvatud juhul, kui nad on kaasatud eksperimenti.

Translokatsiooni heterosügootsuse testimine

Kasutatakse ühte kahest võimalikust meetodist:

— F_1 järglaskonna viljakuse testimine ja järgnev võimalike translokatsiooni kandjate kindlakstegemine tsütogeneetilise analüüsi abil,

— kogu isase F_1 järglaskonna tsütogeneetiline analüüs ilma eelneva fertiilsuse testimisel põhineva selektsioonita.

a) Viljakuse testimine

Vähenenud viljakust F_1 indiviididel saab kindlaks teha pesakonna suuruse põhjal ja/või paaritatud emaste emaka sisu analüüsimisel.

Normaalse ja vähenenud viljakuse määratlemise kriteerium peab olema kasutava hiireliini jaoks kindlaks määratud.

Pesakonna suuruse jälgimine: uuritavad F_1 isased paigutatakse individuaalselt puuridesse kas koos sama eksperimendi või kolooniast saadud emastega. Puure kontrollitakse iga päev 18. paaritusjärgsest päevast alates. Pesakonna suurus ja sooline vahekord registreeritakse F_2 põlvkonna sünnimomendil ja seejärel pesakond likvideeritakse. Kui testitakse emast F_1 järglaskonda, siis jäetakse väikeste pesakondade F_2 järglased ellu edaspidisteks testimisteks. Emaseid translokatsiooni kandjaid kontrollitakse tsütogeneetilise translokatsiooni analüüsiga kõigi nende isaste järeltulijate põhjal. XO-emaseid tuntakse ära sugude suhte muutumise põhjal nende järglaskonnas suhtelt 1:1 suhtele 1:2 isased *vs* emased. Järgnevas protseduuris elimineeritakse normaalsed F_1 loomad edasisest testimisest, kui esimene F_2 pesakond saavutab või ületab predetermineeritud normaalväärtuse, vastasel korral võetakse vaatluse alla teine või kolmas F_2 pesakond.

F_1 loomi, keda ei saa kuni kolme F_2 pesakonna jälgimise põhjal normaalseks tunnistada, kas testitakse edasi paaritatud emaste emaka sisu analüüsimisega või teostatakse kohe tsütogeneetiline analüüs.

Emaka sisu analüüsimine: pesakonna suuruse vähenemine translokatsiooni kandjatel on põhjustatud loodete embrüonaalsest hukkumisest, nii et surnud implantaatide kõrge arv peegeldab translokatsiooni esinemist testitaval loomal. Igat testitavat isaslooma paaritatakse 2–3 emasega. Viljastumine tehakse kindlaks igahommikuse vaginaalkorkide olemasolu kontrollimisega. Emased surmatakse 14–16 päeva pärast ning nende emakates loendatakse elusad ja surnud implantaadid.

b) Tsütogeneetiline analüüs

Testised valmistatakse ette õhu käes kuivatamise tehnika abil. Translokatsiooni kandjad identifitseeritakse multivalentsete konfiguratsioonide leiu alusel diakineesi I metafaasis olevatel primaarsetel spermatotsüütidel. Vähemalt kahe multivalentse assotsiatsiooniga raku leidmine on piisavaks tõestuseks, et testitav loom on translokatsiooni kandja.

Juhul kui aretusselektsiooni pole rakendatud, kontrollitakse kõiki F_1 isasloomi tsütogeneetiliselt. Mikroskoopiliselt tuleb uurida vähemalt 25 diakineesi I metafaasis olevat rakku ühe isase looma kohta. Mitootiliste metafaaside uurimine kas spermatogoonia ajal või luuüdis on nõutav F_1 isaste puhul, kellel on väikesed testised ja meioosi katkemine enne diakineesi või F_1 emastel XO kahtlusalusklaasidel. Ebatavaliselt pika ja/või lühikese kromosoomi olemasolu igas kümnes rakus kümnest on erilise steriilsust põhjustava translokatsiooni (c-t tüüpi) tõenduseks isasloomal. Mõnesid X-autosoomi translokatsioone, mis põhjustavad isaste steriilsust, saab identifitseerida ainult mitootiliste kromosoomide *banding*-analüüsi abil. 39 kromosoomi esinemine igas kümnes mitoosis kümnest on tõestuseks emase XO seisundile.

2. ANDMED

Andmed esitatakse tabeli kujul.

Keskmine pesakonna suurus ja sugude suhe sünnimomendil ja võõrutamise ajal registreeritakse iga paaritusintervalli kohta.

F_1 loomade viljakuse hindamiseks esitatakse keskmine pesakondade suurus kõikide normaalsete paarituste kohta ja individuaalne pesakonna suurus F_1 translokatsiooni kandjatel. Emaka sisaldise analüüsimiseks registreeritakse elus ja surnud implantaatide keskmine arv normaalpaarituste korral ja individuaalsed elus ja surnud implantaatide arvud iga F_1 translokatsiooni kandja paarituse kohta.

Diakineesi I metafaasi tsütokineetilisel analüüsil leitakse multivalentsete konfiguratsioonide arv ja tüübid ja antakse rakkude üldarv iga translokatsiooni kandja kohta.

Steriilsete F_1 indiviidide puhul registreeritakse paarituste üldarv ja paaritusperioodi kestus. Antakse testiste kaalud ja tsütogeneetilise analüüsi detailid.

XO emaste puhul registreeritakse keskmine pesakonna suurus, sugude suhe F_2 järglaskonnas ja tsütogeneetilise analüüsi tulemused.

Kus on võimalik, eelselekteeritakse F_1 translokatsiooni kandjad fertiilsustesti põhjal, tabelid peavad sisaldama informatsiooni selle kohta, kui paljude korral neist oli tõestatud translokatsiooniline heterosügootsus.

Esitatakse negatiivsete ja positiivsete kontrollide testimisandmed.

3. ARUANNE

3.1. Uuringu raport

Uuringu raport peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

— hiirte liin, loomade vanus, töödeldud loomade kaalud,

— mõlemast soost vanemloomade arv katse- ja kontrollgrupis,

— katsetingimused, detailne aine manustamise kirjeldus, annused, lahustid, paarituste skeem,

— järglaste arv ja sugu ühe emase kohta, saadud järglaste arv ja sugu translokatsiooni analüüsil,

— translokatsiooni analüüsi aeg ja kriteeriumid,

— translokatsiooni kandjate arv ja detailne kirjeldus, kus võimaluse korral oleks antud ka paarituste andmed ja emaka sisaldise uurimise andmed,

— tsütogeneetilised protseduurid ja mikroskoopilise uuringu detailid, eelistatavalt koos piltidega,

— statistiline hinnang,

— tulemuste arutelu,

— tulemuste interpretatsioon.

3.2. Hinnang ja interpretatsioon

Vt üldtutvustus B osa.

4. VIITED

Vt üldtutvustus B osa.

C OSA: ÖKOTOKSILISUSE MÄÄRAMISE MEETODID

ÜLDSISSEJUHATUS: C OSA

Järgnevalt kirjeldatud uuringumeetodid on mõeldud osade direktiivi 79/831/EEC lisas VIII loetletud ökotoksikoloogiliste omaduste määramiseks. Tähele tuleks panna, et järgnevalt nimetatud uuringuid VIII lisas tasemel 1 ettenähtud omaduste määramiseks tekstis ei käsitleta:

— pikaajaline toksilisuse uuring *Daphnia magna*'ga,

— uuringud kõrgemate taimedega,

— pikaajaline toksilisuse uuring kaladel,

— liikide akumulatsiooni uuringud.

Kui sobivad uuringumeetodid nimetatud omaduste hindamiseks on lõppenud, avaldatakse need tehnilise progressi edasise kohandamisena. Vahepealses perioodis tuleks kasutada sobivaid ning rahvusvaheliselt tunnustatud meetodeid, mis on heakskiidetud vastava ametkonna poolt.

VETIKATE INHIBEERIMISE TEST

1. **MEETOD**

1.1. **Sissejuhatus**

Testi eesmärk on määrata kindlaks uuritava aine toime üherakulise rohevetika liigi kasvule. Suhteliselt lühike test hindab mõjusid üle mitme põlvkonna. See meetod on kohaldatav kasutamiseks mitmete üherakuliste vetikaliikide puhul, seega tuleb kasutatud meetodi kirjeldusele lisada uuringu raport.

Meetod on kõige lihtsamalt rakendatav veeslahustuvate ainete puhul, mis testi tingimustes tõenäoliselt jäävad vette.

Testi keskkonnas piiratud lahustuvusega ainete puhul ei pruugi EC_{50} kvantitatiivne määramine olla võimalik (vt "Definitsioonid", järgneb).

Seda meetodit saab rakendada ainete puhul, mis otseselt ei häiri vetikate kasvu mõõtmist (ei mõjuta otseselt vetikate kasvu mõõtmist).

Järgnev informatsioon võiks olla testi läbiviimisel kasulik:

— lahustuvus vees,

— aururõhk,

— struktuuri valem,

— aine puhtus,

— keemiline stabiilsus vees ja valguse käes,

— meetodid aine koguse määramiseks vees,

— pK_a väärtus,

— n-oktanooli/vee jaotuskoefitsient,

— täieliku biodegradatsiooni testi tulemused.

1.2. **Definitsioonid ja ühikud**

Rakukontsentratsioon: rakkude arv milliliitris;

Kasv: rakukontsentratsiooni suurenemine testi jooksul;

Kasvu kiirus: rakukontsentratsiooni suurenemine ajaühikus;

EC_{50}: antud meetodi korral uuritava aine selline kontsentratsioon, mis põhjustab kas kasvu või kasvukiiruse 50 %lise vähenemise võrreldes kontrolliga;

NOEC (märgatava mõjuta kontsentratsioon): selle meetodi puhul kõrgeim uuritud kontsentratsioon, mille korral mõõdetud parameetrid ei näita kasvu aeglustumist võrreldes kontrollväärtustega.

1.3. **Võrdlusained**

Võrdlusainet võib uurida kui mitterahuldavate katsetingimuste tuvastamise vahendit. Kui kasutatakse võrdlusainet, esitatakse tulemused uuringu raportis. Võrdlusainena võib kasutada kaaliumdikromaati.

1.4. **Uuringumeetodi põhimõte**

Valitud rohevetikate eksponentsiaalselt kasvavaid kultuure mõjutatakse etteantud tingimustes mitmete põlvkondade vältel uuritava aine erinevate kontsentratsioonidega. Kasvu aeglustumine võrreldes kontrollkultuuriga määratakse kindlaksmääratud perioodi järel.

1.5. **Kvaliteedikriteeriumid**

1.5.1. *Testi usaldusväärsuse tingimused*

Rakukontsentratsioon kontrollkultuurides peaks faktori mõjul olema tõusnud vähemalt 16 korda kolme päeva jooksul.

Testaine kadumine veest biomassi ei muuda testi tingimata kehtetuks.

1.6. **Uuringuprotseduuri kirjeldus**

1.6.1. *Ettevalmistus*

1.6.1.1. Seadmed ja materjalid

— tavaline laborivarustus,

— sobiva mahuga katsekolvid (näiteks sobivad 250 ml koonilised kolvid, kui uuritava lahuse kogus on 100 ml)

— kultiveerimise aparatuur: kapp või kamber, kus saab hoida temperatuuri vahemikus 21 kuni 25 ± 2 °C ja püsivat ühtlast valgustatust spektri vahemikus 400 kuni 700 nm. Soovitatav kvantvoog on $0{,}72\times10^{20}$ footonit/m²s ±20 %. See kvantvoog võrdub 120 µE/m²s ja on saavutatav universaalse valge päevavalguslambiga (valguse temperatuur ligikaudu 4 200 K), mis annab ligikaudu 8 000 luksi mõõdetuna sfäärilise kollektoriga),

— aparatuur rakukontsentratsiooni määramiseks, näiteks elektrooniline osakeste loendaja, mikroskoop loenduskambriga, fluorimeeter, spektrofotomeeter, kolorimeeter (*Märkus:* saamaks spektrofotomeetriga madalate raku kontsentratsioonide korral häid mõõtmistulemusi, võib osutuda vajalikuks küvettide kasutamine, milles valguse teekond oleks vähemalt 4 cm).

1.6.1.2. Vetikate kasvukeskkond

Soovitatav on järgmine sööde:

NH_4Cl:	15	mg/l,
$MgCl_2.6H_2O$:	12	mg/l,
$CaCl_2.2H_2O$:	18	mg/l,
$MgSO_4.7H_2O$:	15	mg/l,
KH_2PO_4:	1,6	mg/l,
$FeCl_3.6H_2O$:	0,08	mg/l,
$Na_2EDTA.2H_2O$:	0,1	mg/l,
H_3BO_3:	0,185	mg/l,
$MnCl_2.4H_2O$:	0,415	mg/l,
$ZnCl_2$:	3×10^{-3}	mg/l,
$CoCl_2.6H_2O$:	$1{,}5\times10^{-3}$	mg/l,
$CuCl_2.2H_2O$:	10^{-5}	mg/l,
$Na_2MoO_4.2H_2O$:	7×10^{-3}	mg/l,
$NaHCO_3$:	50	mg/l.

Selle söötme pH on pärast õhuga tasakaalustamist (ekvilibreerimist) ligikaudu 8.

Teiste söötmete kasutamine pole ülaltoodud nõuete rakendamisel välistatud, kui oluliste koostisosade puhul arvestatakse järgnevate piirangutega:

P:	≤ 0,7 mg/l,
N:	≤ 10 mg/l,
Kelaadid:	≤ 10^{-3} mmol/l,
Kõvadus (Ca+Mg):	≤ 0,6 mmol/l.

Soovitatud sööde ja sööde viitega (1) vastavad sellele nõudmisele.

1.6.1.3. Katseorganismid

Liikide valik

Soovitatakse kasutada kiiresti kasvavaid rohevetikate liike, mida on mugav kultiveerida ja uurida. Sobivateks peetakse järgmisi liike:

— *Selenastrum capricornutum* ATCC 22662,

— *Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG,

— *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11b.

Kui kasutatakse teisi liike, tuleb ära märkida tüvi.

1.6.1.4. Testi kava

Rakkude lähtekontsentratsioon

Soovitatav on, et rakkude lähtekontsentratsioon uuritavates kultuurides oleks *Selenastrum capricornutum*'i ja *Scenedesmus subspicatus*'e kasutamise korral ligikaudu 10^4 rakku/ml. Teiste liikide kasutamise puhul peaks biomass olema samaväärne.

Uuritava aine kontsentratsioonid

Kontsentratsiooni vahemik, kus mõju tõenäoliselt esineb, määratakse vahemiku kindlakstegemise testide tulemuste põhjal. Testi jaoks tuleks valida vähemalt viis geomeetrilisse ritta pandud kontsentratsiooni. Väikseimal uuritaval kontsentratsioonil ei tohi olla vetika kasvule märgatavat mõju. Suurim testitav kontsentratsioon peaks inhibeerima kasvu vähemalt 50 % ulatuses võrreldes kontrolliga ja eelistatavalt võiks peatada kasvu täielikult.

Kordused ja kontrollid

Uuringuplaani peaks kuuluma eelistatavalt kolm kordust iga testi kontsentratsiooni juures ja ideaalis kaks korda nii palju kontrolle. Kui on põhjendatud, võib uuringuplaani muuta ja suurendada kontsentratsioonide arvu ning vähendada kontsentratsioonide korduste arvu.

Kui uuritava aine lahustamiseks kasutatakse lahustit, tuleb uuringuplaani lisada kontroll-analüüsid, kus lahusti kontsentratsioon oleks suurima testis kasutatud väärtusega.

1.6.2. *Uuringu teostamine*

Siin jaotises sisalduvad suunised vees kergesti ja halvasti lahustuvate ainete ja ebapüsivate ainete testimiseks.

1.6.2.1. Vees kergesti lahustuvate ainete testimine

Testi kultuuride, milles on soovitud kontsentratsioonid uuritavat ainet ja soovitud kogus vetika inokulaati, valmistamiseks lahjendatakse testaine põhilahuse ja vetika suspensiooni võrdsed osad (alikvoodid) filtreeritud vetika söötmega.

Kultuuriga kolbe loksutatakse ja pannakse kultiveerimise seadmesse. Uuringu vältel peab hoidma vetikad suspensioonis ja kergendama CO_2 eemaldamist. Selleks võib kasutada loksutamist, segamist ja aereerimist. Kultuure tuleb säilitada temperatuuride vahemikus 21 °C kuni 25 °C ± 2 °C.

Rakukontsentratsioon igas kolvis määratakse vähemalt 24, 48 ja 72 tunni möödumisel testi algusest. Filtreeritud vetikasöödet rakendatakse taustaandmete määramiseks osakeste loenduri kasutamisel või võrdlusfoonina spektrofotomeetri kasutamisel.

pH mõõdetakse testi alguses ja 72 tunni pärast.

Lahuse pH ei peaks normaalselt katse vältel hälbima rohkem kui ühe ühiku võrra.

1.6.2.2. Vees vähese lahustuvusega ainete testimine

Kui uuritava aine lahustuvus on samal tasemel testis kasutatava suurima kontsentratsiooniga, on testi lahuse tegemisel ülaltoodud protseduurist vajalikud vaid väikesed muutused**.** Küllastatud lahus võib olla uuritava aine põhilahuseks. Teise lähenemisviisina võib lahustada uuritava aine soovitud kontsentratsioonil vetikasöötmes enne vetika suspensiooni lisamist.

Vees halvasti lahustuvate ainete põhilahused võib teha mehhaaniliselt dispergeerides või kasutades vetikate jaoks madala toksilisusega lahusteid, nagu orgaanilised solvendid, emulgaatorid ja dispersandid. Kui kasutatakse lahustit, ei tohi kontsentratsioon ületada 100 mg/l ja uuringuplaani tuleb lisada täiendavad kontrollid, mis sisaldavad lahustit testi lahuses olevas suurimas kontsentratsioonis.

1.6.2.3. Ebapüsivate ainete testimine

Tänapäeval pole olemas üldiselt aktsepteeritud ebapüsivate ainete testimise meetodeid. Kui on teada, et ainel on kalduvus aurustuda, võib kasutada suletud kolbe suurendatud pealispinnaga. Pakutakse selle meetodi võimalikke variante (viide (1)).

Tuleb püüda määrata aine hulk, mis jääb lahusesse ning soovitav on olla väga ettevaatlik, kui interpreteeritakse ebapüsivate kemikaalidega tehtud testide tulemusi, mis on saadud suletud süsteemide kasutamisel.

2. **ANDMED JA HINDAMINE**

Uuritavates kultuurides ja kontrollides mõõdetud rakukontsentratsioonid esitatakse tabeli vormis koos uuritava aine kontsentratsioonide ja mõõtmiste aegadega. Kasvukõvera koostamiseks arvutatakse rakukontsentratsioonide keskmised väärtused iga uuritava aine kontsentratsiooni ja kontrolli jaoks iga mõõtmise kohta.

Kontsentratsiooni/mõju seose määramiseks võib kasutada kahte järgnevat lähenemist.

2.1. **Kasvukõvera aluste pindalade võrdlemine**

Kasvukõvera alust pindala võib arvutada järgmise valemi kohaselt:

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

kus:

A = pindala

N_0 = nominaalne rakkude arv/ml ajahetkel t_0,

N_1 = mõõdetud rakkude arv/ml ajahetkel t_1,

N_n = mõõdetud rakkude arv/ml ajahetkel t_n,

t_1 = esimese mõõtmise aeg pärast testi algust,

t_n = mõõtmise n aeg pärast testi algust.

Raku kasvu protsentuaalne inhibitsioon iga testaine kontsentratsiooni (I_A) jaoks arvutatakse kui kontrolli kasvukõvera aluse pindala (A_c) ja testaine iga kontsentratsiooni kasvukõvera aluse pindala (A_t) vahe, kui:

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

I_A väärtused kantakse poollogaritmilisele või poollogaritmilisele paberile vastavate kontsentratsioonide kohale. Paberile märkimise korral ühendatakse punktid sirgjoonega silma järgi või kui võib oletada väärtuste log-normaalsust, võib tõmmata väljaarvutatud regressiooni joone.

EC_{50} väärtus saadakse regressioonijoone ja abtsissteljele punktist I_A = 50 % tõmmatud paralleeli lõikumiskohast. Tähistamaks seda väärtust selle arvutusmeetodi puhul ühemõtteliselt, soovitatakse kasutada sümbolit E_bC_{50}. Selle meetodi jaoks, mis spetsifitseerib mõõtmised 24, 48 ja 72 tunni pärast, on sümboliks E_bC_{50} (0–72 h).

Teised EC väärtused nagu E_bC_{10}, võib samuti tuletada graafikult I_A *versus* log kontsentratsioon.

2.2. **Kasvukiiruste võrdlemine**

Keskmine liigi kasvukiirus (μ) eksponentsiaalselt kasvavate kultuuride jaoks on arvutatav kui

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_1}{t_n - t_1}$$

Alternatiivselt võib liigi keskmise (spetsiifilise) kasvukiiruse tuletada regressiooni joone tõusu kaudu In graafikult N *versus* aeg.

Liigi kasvukiiruse protsentuaalne vähenemine iga testiaine kontsentratsiooni juures võrreldуna kontrollväärtusega kantakse graafikule kontsentratsiooni logaritmi suhtes. Nende EC_{50} saab välja lugeda graafikult. Tähistamaks selle meetodiga saadud EC_{50} väärtust ühemõtteliselt, soovitatakse kasutada sümbolit E_rC_{50}. Näidatud peab olema mõõtmise aeg, näiteks kui väärtus kehtib 24 ja 48 tunni järel tehtud vaatluste kohta, on sümboliks E_rC_{50} (24–48 h).

Märkus: liigi kasvukiirus on logaritmiline suurus ja väikesed muutused kasvu kiiruses võivad viia suurte muutusteni biomassis.

3. **ARUANNE**

Uuringu raport peab võimalused sisaldama järgmist:

— uuritav aine: keemilise identifitseerimise andmed,

— katseorganismid: päritolu, labori kultuur, tüve number, kultiveerimise meetod,

— katsetingimused:

  — uuringu alguse ja lõpu kuupäev ja kestus,

  — temperatuur,

  — söötme koostis,

— kasvatamise aparatuur,

— lahuse pH testi alguses ja lõpus (lisada selgitused, kui ilmnesid pH väärtuse suuremad kui üheühikulised muutused),

— lahusti ja testiaine lahustamise meetod ja lahusti kontsentratsioon testi lahuses,

— valguse intensiivsus ja kvaliteet,

— testitud kontsentratsioonid (mõõdetud või nominaalsed).

— Tulemused:

— rakukontsentratsioon igas kolvis iga mõõtmise ajal ja rakukontsentratsiooni mõõtmise meetod,

— rakukontsentratsioonide keskmised väärtused

— kasvukõverad,

— kontsentratsiooni mõju seose graafiline esitus,

— EC väärtused ja arvutamise meetod,

— NOEC (märgatava mõjuta kontsentratsioon),

— teised täheldatud mõjud.

4. **VIITED**

1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 201*, Decision of the Council C(81) 30 Final.

2) Umweltbundesamt, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag "Hemmung der Zellvermehrung bei der Grünalge *Scenedesmus subspicatus*", in: Rudolph/Boje: *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

Liide

VETIKATE KASVATAMISE PROTSEDUURI NÄIDE

Üldised märkused

Kultiveerimise eesmärgiks järgneva metoodika alusel on saada vetikakultuurid toksilisuse testide jaoks.

Tuleb kasutada sobivaid meetodeid, et vältida vetikakultuuride nakatumist bakteritega (ISO 4833). Akseenilised (steriilsed) kultuurid on soovitatavad, kuid ühevetikalised kultuurid on hädavajalikud.

Kõik operatsioonid tuleb teha steriilsetes tingimustes, et vältida saastumist bakterite ja teiste vetikatega.

Seadmed ja materjalid

Vaata punktis 1.6.1: Ettevalmistused ja katseorganismid.

Protseduurid vetikakultuuride saamiseks

Toitelahuse (söötme) valmistamine

Kõik söötme toitesoolad valmistatakse kontsentreeritud põhilahustena ning säilitatakse pimedas ja külmas. Need lahused steriliseeritakse filtreerimise või autoklaavimisega.

Söötme valmistamiseks lisatakse vajalik kogus põhilahust steriilsele destilleeritud veele, jälgides, et ei toimuks kontaminеerumist. Tahke söötme saamiseks lisatakse 0,8 % agarit.

Põhikultuur

Põhikultuurid on väikesed vetikakultuurid, mida regulaarselt viiakse värskesse söötmesse, et see püsiks testi algmaterjalina. Kui kultuure ei kasutata regulaarselt, külvatakse nad kaldagari tuubidesse. Need viiakse värskesse söötmesse vähemalt iga kahe kuu järel.

Põhikultuure kasvatatakse koonilistes kolbides sobival söötmel (maht umbes 100 ml). Kui vetikaid inkubeeritakse 20 °C pidevas valgustatuses, on vajalik iganädalane ümberkülv.

Ümberkülvi ajal viiakse steriilse pipetiga teatud kogus "vana" kultuuri värsket söödet sisaldavasse kolbi nii, et kiirekasvuliste liikide puhul algne kontsentratsioon oleks umbes 100 korda väiksem kui vanas kultuuris.

Liigi kasvukiirust saab määrata kasvukõveralt. Kui see on teada, on võimalik hinnata, kui sageli peab kultuuri uude söötmesse üle viima. Seda tuleb teha enne, kui kultuur jõuab surma faasi.

Eelkultuur

Eelkultuur on kavandatud teatud koguse testkultuuri inokuleerimiseks sobivate vetikate saamiseks. Eelkultuuri inkubeeritakse testi tingimustes ja kasutatakse, kui see kasvab veel eksponentsiaalselt, tavaliselt pärast kolmepäevast inkubatsiooniperioodi. Kui vetikakultuuris on deformeerunud või ebanormaalseid rakke, tuleb need eemaldada.

TOKSILISUS VIHMAUSSIDELE

TEHISMULLA TEST

1. MEETOD

1.1. Sissejuhatus

Selles laboratoorses testis lisatakse uuritav aine tehismullale, milles 14 päeva jooksul usse hoitakse. Peale seda perioodi (ja valikuliselt peale seitset päeva) uuritakse testi aine letaalset mõju vihmaussidele. Test annab suhteliselt kiire meetodi naha ja seedekulgla kaudu omastatavate kemikaalide mõju skriinimiseks vihmaussidel.

1.2. Definitsioon ja ühik

LC_{50}: Aine kontsentratsioon, mis arvestuslikult tapab uuringuperioodil 50 % testi loomadest.

1.3. Võrdlusaine

Võrdlusainet kasutatakse perioodiliselt kui vahendit näitamaks, et testi süsteemi tundlikkus pole oluliselt muutunud.

Võrdlusainena soovitatakse kasutada analüütilise klassi kloroatsetamiidi.

1.4. Uuringumeetodi põhimõte

Muld on varieeruv keskkond, seepärast kasutatakse selles testis hoolikalt määratletud tehislikku liivsavi mulda. Täiskasvanud vihmausse liigist *Eisenia foetida* (vt märkust lisas) hoitakse kindlas tehismullas, mida on töödeldud uuritava aine erinevate kontsentratsioonidega. Konteinerite sisu puistatakse kandikule laiali 14 päeva (ja valikuliselt seitse päeva) peale katse algust ning loendatakse iga kontsentratsiooni juures ellujäänud vihmaussid.

1.5. Kvaliteedikriteeriumid

Test on planeeritud testi substraadi ja organismi osas võimalikult hästi korratavana (reprodutseeritavana). Suremus kontrollis ei tohi testi lõpuks olla kõrgem kui 10 %, vastasel juhul on test kehtetu.

1.6. Uuringumeetodi kirjeldus

1.6.1. *Materjalid*

1.6.1.1. Testi substraat

Testi põhisubstraadina kasutatakse kindla koostisega tehismulda.

a) Põhisubstraat (protsendid on antud kuivkaalu kohta)

— 10 % *Sphagnum*'i turvast (pH võimalikult lähedal vahemikule 5,5–6,0 ning ilma nähtavate taimejäänusteta, ühtlaselt peenestunud),

— 20 % kaoliniitsavi, milles võiks olla üle 50 % kaoliniiti,

— umbes 69 % tööstuslikku kvartsiliiva (ülekaalus oleva peene liiva osakestest üle 50 % on suurusega 0,05 kuni 0,2 mm). Kui aine vees piisavalt ei dispergeeru, tuleb jätta 10 g iga testi konteineri jaoks saadavale, et see hiljem testi ainega segada,

— lisatakse umbes 1 % keemiliselt puhast peenestatud kaltsiumkarbonaati ($CaCO_3$), et pH oleks 6,0±0,5.

b) Testi substraat

Testi substraat sisaldab põhisubstraati, testi ainet ja deioniseeritud vett.

Veesisaldus on 25–42 % põhisubstraadi kuivkaalust. Substraadi veesisaldus määratakse kindlaks proovi kuivatamisel 105 °C juures konstantse kaaluni. Võtmekriteerium on, et tehismuld tuleb niisutada punktini, kus pole seisvat vett. Segamisel tuleb hoolega jälgida, et substraat ja uuritav aine seguneksid ühtlaselt. Ära tuleb näidata uuritava aine substraati viimise viis.

c) Kontroll-substraat

Kontroll-substraat koosneb põhisubstraadist ja veest. Kui kasutatakse mõnda lisaainet, peab täiendav kontroll sisaldama sama koguse seda lisaainet.

1.6.1.2. Katseanumad

Umbes üheliitrise mahuga klaasanumad (kaetud plastkaante, katete või plastkilega, milles on ventileerimiseks augud), mis on täidetud 500 g kuivale substraadile vastava koguse märja test- või kontroll-substraadiga.

1.6.2. *Katsetingimused*

Konteinereid tuleb hoida kliimakambris temperatuuri 20 ± 2 °C pidevas valguses. Valgusintensiivsus peaks olema 400 kuni 800 luksi.

Uuringuperiood on 14 päeva, kuid suremust võib hinnata valikuliselt seitse päeva peale testi algust.

1.6.3. *Uuringu protseduur*

Testi kontsentratsioonid

Uuritava aine kontsentratsioonid väljendatakse aine massina põhisubstraadi kuivkaalu kohta (mg/kg).

Vahemiku leidmise test

Kontsentratsioonide vahemikku, mis põhjustab 0–100 %lise surevuse, võib määrata vahemiku leidmise testiga. Nii saadakse informatsiooni kontsentratsioonide vahemiku kohta, mida tuleb kasutada lõplikus testis.

Ainet tuleks uurida järgnevate kontsentratsioonide juures: 1 000; 100; 10; 1; 0,1 mg ainet/kg uuritava substraati (kuivkaalus) kohta.

Kui tehakse täielik lõplik test, piisab vahemiku leidmiseks ühest uuringuseeriast iga kontsentratsiooni kohta ja ühest uuringuseeriast töötlemata kontrolli kohta, igas seerias 10 vihmaussi.

Lõplik uuring

Vahemiku leidmiseks teostatud uuringu tulemusi kasutatakse vähemalt viie geomeetrilises reas oleva kontsentratsiooni valimiseks, mis katavad surevuse vahemiku 0–100 % ja erinevad konstantse faktori poolest, mis ei ole suurem kui 1,8.

Uuringud, mis kasutavad neid kontsentratsiooni seeriaid, peaks võimaldama LC_{50} väärtust ja selle usaldatavuse piire hinnata nii täpselt kui võimalik.

Definitiivse testi puhul kasutatakse vähemalt nelja uuringukomplekti iga kontsentratsiooni kohta ja nelja töötlemata kontrolli, igas 10 ussi. Nende korduskomplektide tulemused esitatakse keskmise ja standardhälbe kujul.

Kui kaks järjestikust kontsentratsiooni suhtega 1,8 annavad ainult 0 % ja 100 % surevuse, siis need kaks väärtust on piisavad näitamaks vahemikku, kuhu LC_{50} langeb.

Uuringu põhisubstraadi ja uuritava aine segu

Kui vähegi võimalik tuleks testi substraat valmistada ilma igasuguse lisaaineta, v.a vesi. Vahetult enne uuringu algust segatakse uuritavast ainest deioniseeritud vette või muusse lahustisse tehtud emulsioon või dispersioon uuringu põhisubstraadiga või pritsitakse ühtlaselt selle peale peene kromatograafilise või sellesarnase pihustiga.

Vees lahustumatu testaine võib lahustada võimalikult väikeses sobiva orgaanilise lahusti koguses (näiteks heksaan, atsetoon või kloroform).

Uuritava aine lahustamiseks, dispergeerimiseks või emulgeerimiseks võib kasutada ainult kergesti lagunevaid aineid. Uuritavat substraati tuleb enne kasutamist aereerida. Aurustunud vesi tuleb samas koguses asendada. Kontroll peab sisaldama sama koguse iga lisaainet.

Kui uuritav aine pole orgaanilises lahustis lahustatav, dispergeeritav või emulgeeritav, segatakse 10 g peeneteralise kvartsliiva ja 500 g kuivkaalus tehismulla töötlemiseks vajaliku testaine segu 490 g kuiva testi substraadiga.

Iga testi komplekti jaoks pannakse igasse klaasanumasse 500 g kuivkaalus substraadiga ekvivalentne kogus niisket substraati ning uuritava substraadi pinnale 10 vihmaussi, keda on eelnevalt 24 tunni jooksul hoitud samasuguses niiskes põhisubstraadis, siis kiirelt pestud ja enne kasutamist filterpaberil üleliigsest veest kuivatatud.

Konteinerid kaetakse perforeeritud plastkaante, katete või kilega vältimaks substraadi kuivamist ning hoitakse 14 päeva katsetingimustes.

Hindamised tuleb teha 14 päeva (valikuliselt seitse päeva) pärast katse üles seadmist. Substraat laotatakse klaasist või roostevabast terasest tehtud alusele. Vihmaussid vaadatakse üle ja loetakse kokku ellujäänud vihmaussid. Vihmaussid tunnistatakse surnuks, kui nad ei vasta keha eesosa õrnale mehhaanilisele stimuleerimisele.

Kui ülevaatus tehakse seitsmendal päeval, täidetakse konteiner uuesti substraadiga ja ellujäänud vihmaussid pannakse sama testsubstraadi pinnale tagasi.

1.6.4. *Katseorganismid*

Katseorganismideks peavad olema täiskasvanud *Eisenia foetida* eksemplarid (vt märkust liites) (vähemalt kahe kuu vanused, klitellumiga) kaaluga 300 kuni 600 mg. (kasvatamise meetodeid vaata lisast)

2. **ANDMED**

2.1. **Tulemuste töötlemine ja hindamine**

Uuritud aine kontsentratsioonid esitatakse vastavate surnud vihmausside protsentide suhtes.

Kui andmed on küllaldased, määratakse LC_{50} väärtus ja usalduspiirid ($p = 0,05$) standardmeetodite abil (Litchfield and Wilcoxon, 1949, ekvivalentne meetod). LC_{50} esitatakse kui testaine (mg) uuritava substraadi (kg) kohta (kuivkaalus).

Neil juhtudel, kui kontsentratsioonikõvera tõus on liiga järsk LC_{50} arvutamise võimaldamiseks, piisab selle väärtuse graafilisest hindamisest.

Kui kaks järjestikust kontsentratsiooni vahega 1,8 annavad ainult 0 % ja 100 % surevuse, piisab neist kahest väärtusest selle vahemiku näitamiseks, kuhu LC_{50} jääb.

3. **ARUANNE**

3.1. **Uuringu raport**

Uuringu raport peaks võimalusel koosnema järgmisest:

— kinnitus, et uuring on läbi viidud vastavalt ülalmainitud kvaliteedikriteeriumidele,

— läbiviidud katse (vahemiku leidmise uuring ja/või lõplik test),

— katsetingimuste täpne kirjeldus või kinnitus, et uuring on läbiviidud kooskõlas meetodiga; kõik kõrvalekalded tuleb loetleda,

— täpne uuritava aine ja põhisubstraadi segamise kirjeldus,

— katseorganisme puudutav informatsioon (liik, vanus, keskmine kaal ja kaalude vahemik, hoidmise ja paljundamise tingimused, tarnija)

— LC_{50} määramiseks kasutatud meetod,

— uuringu tulemused koos kõigi kasutatud andmetega,

— katseorganismidel täheldatud sümptomite või käitumise muutuste kirjeldus,

— surevus kontrollides,

— LCso või kõrgeim testitud ilma surevuseta kontsentratsioon ja madalaim 100 %lise surevusega testitud kontsentratsioon 14 päeva (ja valikuliselt seitse päeva) peale testi ülespanemist,

— kontsentratsiooni/vastusreaktsiooni kõvera joonistamine,

— võrdlusaine abil saadud tulemused, kas seoses käesoleva uuringuga või varasematest kvaliteedikontrollidest.

4. **VIITED**

1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 207*, Decision of the Council C(81) 30 final.

2) Edwards, C. A. and Lofty, J. R., 1977, *Biology of Earthworms*, Chapman and Hall, London, 331 pp.

3) Bouche, M. B., 1972, *Lombriciens de France, Écologie et Systématique*, Institut National de la Recherche Agronomique, 671 pp.

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- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag "Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden", in: Rudolph/Boje, *Ökotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

Liide

Vihmausside kasvatamine ja hoidmine enne uurimist

Loomade paljundamiseks pannakse 30 kuni 50 täiskasvanud ussi värske substraadiga kasvatamise karpi, kust nad võetakse välja 14 päeva pärast. Neid loomi võib kasutada edaspidiste paljundamiste jaoks. Kookonitest koorunud vihmausse kasutatakse uuringuks, kui nad on täiskasvanud (ettenähtud tingimustes kahe või kolme kuu pärast).

Hoidmise ja paljundamise tingimused

Kliimakamber:	temperatuur 20±2 °C, eelistatavalt pidevas valguses (intensiivsus 400 kuni 800 luksi).
Kasvatamise karbid:	sobivad 10 kuni 20 l mahuga madalad anumad.
Substraat:	*Eisenia foetida*'t võib kasvatada erinevate loomade ekskrementides. Kasvukeskkonnana soovitatakse 50 % turba ja 50 % lehma või hobuse sõnniku segu. Segu pH peaks olema 6 kuni 7 (reguleerida kaltsiumkarbonaadiga) ja ioonjuhtivus madal (väiksem kui 6 mmhos või 0,5 % soola kontsentratsioon). Substraat peab olema niiske, kuid mitte liiga märg. Lisaks ülaltoodud meetodile võib kasutada ka teisi tulemuslikke metoodikaid.

Märkus: eksisteerib mitu *Eisenia foetida* rassi, mida mõned taksonomistid on eristanud liikidena (Bouche, 1972). Need on morfoloogiliselt sarnased peale *Eisenia foetida foetida*, mille segmendid on tüüpiliselt põikitriipude või -ribadega ja *Eisenia foetida andrei*, millel need puuduvad ja punane värvus on varigeerunud. Võib kasutada teisi liike, kui vajalik metoodika on olemas.

BIODEGRADATSIOON

ZAHN-WELLENSI TEST

1. **MEETOD**

1.1. **Sissejuhatus**

Käesolev meetod on mõeldud vesilahustuvate mittelenduvate orgaaniliste ainete täieliku biodegradatsiooni hindamiseks staatilises testis, eksponeerituna suhteliselt suurele mikroorganismide kontsentratsioonile.

Võimalik on füüsikalis-keemiline adsorptsioon suspendeeritud kuivainele, mida tuleks arvestada tulemuste interpreteerimisel (vt 3.2).

Uuritavaid aineid kasutatakse kontsentratsioonides, mis vastavad LOS-väärtustele vahemikus 50 kuni 400 mg/l või KHT-väärtustele vahemikus 100 kuni 1 000 mg/l (LOS = lahustunud orgaaniline süsinik, KHT = keemiline hapnikutarve). Nende suhteliselt suurte kontsentratsioonide eeliseks on analüütiline usaldusväärsus. Toksilise toimega ühendid võivad lagunemisprotsessi aeglustada või inhibeerida.

Selle meetodi puhul kasutatakse uuritava aine täieliku bioloogilise lagunemise hindamiseks lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarve mõõtmist.

Samaaegne spetsiifilise analüüsimeetodi rakendamine võib anda võimaluse määrata aine primaarset biolagunemist (eelühendi keemilise struktuuri kadumine).

Meetod on kasutatav ainult nende uuritavate orgaaniliste ainete puhul, mis testis kasutatud kontsentratsiooni juures:

— on katsetingimustel veeslahustuvad,

— omavad katsetingimustel ebaolulist aururõhku,

— ei ole bakterite suhtes pärssiva toimega,

— imenduvad katsesüsteemi vaid piiratud ulatuses,

— ei kao katselahusest vahu tekke tulemusena.

Uuringutulemuste interpreteerimisel on kasulik teada uuritava materjali põhikomponentide kohta käivat informatsiooni. Seda eelkõige juhtudel, kui tulemused on väga väikesed või alammääralised.

Informatsioon uuritava aine toksilisusest mikroorganismidele on vajalik väikeste tulemuste tõlgendamisel ja sobivate kontsentratsioonide valimisel.

1.2. **Definitsioonid ja ühikud**

Uuringu lõpuks saavutatud biolagunemise määr on Zahn-Wellensi testis tuntud kui "biolagunemine":

$$D_T\ (\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

kus:

D_T = biodegradatsioon (%) ajahetkel T,

C_A = LOS- (või KHT-) väärtused testisegus kolm tundi pärast testi algust (mg/l) (LOS = lahustunud orgaaniline süsinik, KHT = keemiline hapnikutarve),

C_T = LOS- või KHT-väärtused testisegus proovi võtmise ajal (mg/l),

C_B = LOS- või KHT-väärtused "tühja" proovi võtmise ajal (mg/l),

C_{BA} = tühja proovi LOS- või KHT-väärtused, mõõdetuna kolm tundi pärast testi algust (mg/l).

Lagunemise ulatus ümardatakse lähima täisarvulise protsendini.

Lagunemise protsent esitatakse kui LOS-i (või KHT) eraldamine testitavast ainest.

Erinevus kolme tunni järel mõõdetud väärtuse ja arvutatud või eelistatult mõõdetud algväärtuse vahel võib anda kasulikku informatsiooni aine eliminatsiooni kohta (vt 3.2. "Tulemuste tõlgendamine").

1.3. **Võrdlusained**

Mõnel juhul, kui uuritakse uusi aineid, võivad võrdlusained olla kasulikud, siiski ei saa veel soovitada spetsiifilisi võrdlusaineid.

1.4. **Uuringumeetodi põhimõte**

Aktiivmuda, mineraalsed toitained ja uuritav materjal (ainuke süsiniku allikas vesilahuses) segatakse kokku ühe- kuni neljaliitrises klaasanumas, mis on varustatud segisti ja aeraatoriga. Segu segatakse ja aereeritakse 20 kuni 25 °C juures üldvalgustatud või pimedas ruumis kuni 28 päeva. Lagunemisprotsessi jälgitakse LOS- (või KHT-) väärtuste määramisel filtreeritud lahuses, mida tehakse iga päev või muude sobivate ajavahemike järel. Kõikide ajavahemike järel mõõdetud elimineeritud LOS- (või KHT-) väärtuste suhet kolme tunni möödumisel saadud näitajaga väljendatakse protsentides biodegradatsioonina. Saadud tulemus näitab degradatsiooni ulatust antud ajavahemikus.

Kui kasutatakse spetsiifilist analüüsimeetodit, saab mõõta biodegradatsioonist tingitud eellasmolekuli kontsentratsiooni muutusi (primaarne biodegradatsioon).

1.5. **Kvaliteedikriteeriumid**

Käesoleva katse korduvteostatavus on ringtesti järgi piisav.

Käesoleva meetodi tundlikkuse määrab suures osas põhilahuse varieeruvus ning vähesemal määral lahustunud orgaanilise süsiniku määramise täpsus ja uuritava ühendi sisaldus vedelikus iga tsükli alguses.

1.6. **Uuringuprotseduuri kirjeldus**

1.6.1. *Ettevalmistused*

1.6.1.1. Reagendid

Uuritav vesi: joogivesi, mille orgaanilise süsiniku sisaldus on < 5 mg/l. Kaltsium- ja magneesiumioonide kontsentratsioon ei tohi koos ületada näitajat 2,7 mmol/l; vastasel juhul on vaja piisav lahjendus deioniseeritud või destilleeritud veega.

Väävelhape, analüüsi reagent (A.R.):	50 g/l.
Naatriumihüdroksiidi lahus A.R.:	40 g/l.
Mineraalainetega toitelahus: lahustada ühes liitris deioniseeritud vees:	
ammooniumkloriid, NH_4Cl, A.R.:	38,5 g,
naatriumdivesinikfosfaat, $NaH_2PO_4.2H_2O$, A.R.:	33,4 g,
kaaliumdivesinikfosfaat, KH_2PO_4, A.R.:	8,5 g,
dikaaliumvesinikfosfaat, K_2HPO_4, A.R.:	21,75 g.

Segu on nii toitelahuseks kui ka puhversüsteemiks.

1.6.1.2. Aparatuur

Klaasnõud mahuga üks kuni neli liitrit (näiteks silindrilised anumad).

Segisti klaasist või metallist segajaosaga sobiva varre küljes (segaja peaks pöörlema ligikaudu 5 kuni 10 cm kõrgemalt anuma põhjast). Kasutada võib ka 7 kuni 10 cm pikkuse pulgaga magnetsegajat.

2 kuni 4 mm siseläbimõõduga klaastoru õhu sissejuhtimiseks. Toru avaus peaks olema ligikaudu 1 cm kõrgusel anuma põhjast.

Tsentrifuug (ligikaudu 3 550 g).

pH-meeter.

Lahustunud hapniku mõõtmise seade.

Paberfiltrid.

Aparatuur membraanfiltreerimiseks.

Membraanfiltrid poori läbimõõduga 0,45 µn. Membraanfiltrid on sobivad, kui on kindel, et nad ei lase läbi süsinikku ega absorbeeri aineid filtratsiooni etapis.

Analüüsivarustus orgaanilise süsiniku sisalduse ja hapnikutarve määramiseks.

1.6.1.3. Inokulaadi valmistamine

Reoveepuhastist pärit aktiivmuda pestakse (korduvalt) tsentrifuugimisel või katsevees setitamisel (vt ülalt).

Aktiivmuda peab olema sobivate omadustega. Sellist muda saadakse õigesti töötavatest reoveepuhastitest. Võimalikult paljude erinevate bakteriliikide ja -tüvede saamiseks võib olla sobivaim meetod erinevatest allikatest pärit inokulaatide kokku segamine (näiteks erinevad reoveepuhastid, mullaekstraktid, jõevesi jne). Segu tuleb töödelda nagu allpool kirjeldatud.

Aktiivmuda aktiivsuse kontrollimiseks vt allpool "Funktsionaalne kontroll".

1.6.1.4. Katselahuste valmistamine

Valada anumasse 500 ml katsevett, 2,5 ml/l mineraalainetega toitelahust ja aktiivmuda koguses, mis annab lõpliku segu kuivaine sisalduseks 0,2 kuni 1,0 g/l. Lisada piisavalt uuritava aine põhilahust, et lõpliku segu LOS-kontsentratsioon oleks 50 kuni 400 mg/l. Vastavad KHT-väärtused on 100 kuni 1 000 mg/l. Lisage katsevett kuni üldkoguseks on üks kuni neli liitrit. Valitav lõppkogus oleneb KHT- ja LOS-määramiseks võetud proovide arvust ja analüüsiprotseduurideks vajalikust kogusest.

Normaalsel juhul on piisavaks koguseks kaks liitrit. Paralleelselt iga katseseeriaga hakatakse kasutama vähemalt ühte kontrollnõud ("tühi"); see sisaldab ainult aktiivmuda ja mineraalainetega toitelahust, mis lahustatakse katseveega teiste anumates olevate lahustega sama koguseni.

1.6.2. *Katse läbiviimine*

Katsenõudes olevat lahust segatakse magnetsegajaga või kruvipropelleriga üldvalgustatud või pimedas ruumis temperatuuril 20 kuni 25 °C. Aeratsiooni teostatakse suruõhuga, mida puhastatakse vajadusel läbi puuvillast filtri või veega täidetud pesupudeli. Muda ei tohi settida ja hapniku kontsentratsioon ei tohi langeda alla 2 mg/l.

pH-väärtust tuleb kontrollida regulaarsete ajavahemike järel (näiteks üks kord päevas) ja kohandada vajadusel väärtusele pH 7 kuni 8.

Aurustumisest tingitud kaod taastatakse vahetult enne proovi võtmist deioniseeritud või destilleeritud veega vastavalt vajalikule kogusele. Soovitatav on enne testi alustamist märkida ära vedelikunivoo kõrgus anumas. Uued märked tehakse pärast iga proovi võtmist (aereerimise ja segamiseta). Esimesed proovid võetakse alati kolm tundi pärast katse alustamist, et kindlaks teha uuritava materjali adsorptsiooni aktiivmuda poolt.

Uuritava aine eliminatsiooni jälgitakse LOS- ja KHT-määramistega iga päev või muude ajavahemike järel. Katse- ja kontrollnõust võetud proovid filtreeritakse läbi hoolikalt pestud paberfiltri. Esimesed 5 ml uuritavat lahusefiltraati visatakse ära. Raskesti filtreeritavad mudaosad eemaldatakse eelnevalt 10minutilise tsentrifuugimise teel. LOS- ja KHT-määramisi tehakse vähemalt kaks korda ühest proovist. Katse kestuseks on kuni 28 päeva.

Märkus: häguseks jäänud proovid filtreeritakse läbi membraanfiltrite. Membraanfiltrid ei tohi vabastada ega adsorbeerida ühtegi orgaanilist ainet.

Aktiivmuda funktsionaalne kontroll

Paralleelselt katseanumatega kasutatakse teatud kindlat lahust sisaldavat anumat, et kontrollida aktiivmuda funktsionaalsust. Dietüleenglükool on sellisel juhul osutunud kasulikuks kontroll-lahuseks.

Adaptatsioon

Kui analüüse teostatakse suhteliselt lühikeste ajavahemike järel (näiteks kord päevas), on võimalik adaptatsiooni selgelt jälgida degradatsiooni kõvera peal (vt joonis 2). Seetõttu ei tohiks katset alustada vahetult enne nädalavahetust.

Kui adaptatsioon tekib perioodi lõpus, võib katset pikendada kuni degradatsiooni lõppemiseni.

Märkus: kui vajatakse täpsemat informatsiooni adapteerunud muda käitumise kohta, võib sama aktiivmuda veel kord panna kokku sama uuritava materjaliga vastavalt järgnevalt kirjeldatud protseduurile:

Lülitada segaja ja aeraator välja ja lasta aktiivmudal settida. Visata ära supernatant, täita anum katseveega kuni kahe liitrini, segada 15 minutit ja lasta jälle settida. Kui supernatant on jälle ära visatud, kasutage järelejäänud muda katse kordamiseks vastavalt eespool olevatele punktidele 1.6.1.4 ja 1.6.2. Aktiivmuda võib setitamise asemel eraldada ka tsentrifuugimise teel.

Adapteerunud muda võib segada värske mudaga kontsentratsioonini 0,2 kuni 1 g kuivainet/l.

Analüüsi käik

Tavalisel juhul filtreeritakse proovid läbi hoolikalt pestud paberfiltri (pesemiseks kasutada ioniseeritud vett).

Häguseks jäänud proovid filtreeritakse läbi membraanfiltrite (0,45 μm).

LOS-kontsentratsiooni määratakse ühest proovi filtraadist kaks korda (esimesed 5 ml tuleb ära visata) TOC järgi. Kui infiltraati ei ole võimalik analüüsida samal päeval, tuleb seda kuni järgmise päevani säilitada külmkapis. Pikemaajaline säilitamine ei ole soovitatav.

KHT-kontsentratsiooni määratakse proovi filtraatidest KHT-analüüsi meetodil, mida on kirjeldatud näitlikult allpool (2).

2. ANDMED JA HINDAMINE

LOS- ja/või KHT-kontsentratsioone määratakse ühest proovist vähemalt kaks korda, vastavalt eespool olevale punktile 1.6.2. Degradatsiooni ajahetkel T arvutatakse vastavalt valemile (definitsioonidega) mis on äratoodud eespool olevas punktis 1.2.

Degradatsiooni ulatus ümardatakse lähima täisarvulise protsendini. Katse lõpus kindlaks tehtud degradatsiooni näitajat esitatakse kui "Biolagundatavus Zahn-Wellensi testi järgi".

Märkus: kui täielik degradatsioon saavutatakse enne katseaja lõppemist ja seda tulemust kinnitatakse järgneval päeval, võib katse lõpetada.

3. ARUANNE

3.1. Uuringu raport

Võimaluse korral peaks uuringu raport sisaldama järgnevat:

— uuritava aine algkontsentratsioon,

— kõik ülejäänud informatsioon ja katsetulemused, mis puudutavad uuritavat ainet, võrdlusainet (kui kasutati) ja "tühja" proovi,

— kontsentratsioon kolme tunni möödumisel,

— biodegradatsiooni kõver koos selgitustega,

— kuupäev ja koht, kust võeti uuritavate organismide proov, adapteerumise kirjeldus, kasutatud kontsentratsioon jne,

— uuringuprotseduuri muutuste teaduslik põhjendus.

3.2. Tulemuste tõlgendamine

LOS- (KHT-) vähenemine, mis leiab aset järk-järgult päevade ja nädalate jooksul, viitab uuritava aine biodegradeerumisele.

Mõnikord võib olulist rolli mängida füüsikalis-keemiline adsorptsioon. See on näidatud juhul, kui esineb täielik või osaline lisatud LOS-eliminatsioon alguses (esimese kolme tunni jooksul) ning erinevused kontrolli ja katse supernatandi vahel jäävad oodatust väiksemateks.

Kui biodegradatsiooni (või osalise biodegradatsiooni) ja adsorptsiooni tuleb eristada, on vajalikud täiendavad testid.

Seda saab teha mitmel erineval viisil, kuid kõige usaldusväärsem on supernatantvedeliku või muda kasutamine inokulaadina baasuuringu raames (eelistatult respiromeetriline uuring).

Selles uuringus tuleks kõrgeid, adsorptsiooni teel mitte-eemaldatavaid LOS- (KHT-) tulemusi pidada potentsiaalselt biolagundatavateks. Osaline adsorptsiooni teel mitte-eemaldamine viitab sellele, et kemikaal allub vähemalt osalisele biodegradatsioonile. LOS-eemaldamise madalate või null-näitajate põhjuseks võib olla mikroorganismide pärssimine uuritava aine poolt ja selle võib vallandada ka muda lõhustamine või kadu, mis tekitab häguse supernatandi. Testi tuleks korrata, kasutades uuritava aine madalamaid kontsentratsioone.

Spetsiifilise analüütilise meetodi või ^{14}C-märgistatud uuritava aine kasutamine võib anda suurema tundlikkuse. ^{14}C testi ühendi kasutamisel $^{14}CO_2$ sedastamine kinnitab biodegradatsiooni teket.

Kui tulemusi antakse ka primaarse biodegradatsiooni kohta, tuleks võimaluse korral anda selgitus keemilise struktuuri muutustele, mis viib uuritava eellasühendi vastusreaktsiooni kadumisele.

Analüütilise meetodi kinnitus tuleb edastada koos vastusega, mis saadi puhta katsekeskkonna kohta.

4. **VIITED**

1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 302 B*, Decision of the Council C(81) 30 final.

2) Annex V C.9 Degradation: Chemical Oxygen Demand, Commission Directive 84/449/EEC, *Official Journal of the European Communities*, No L 251, 19. 9. 1984.

Liide

HINDAMISE NÄIDE

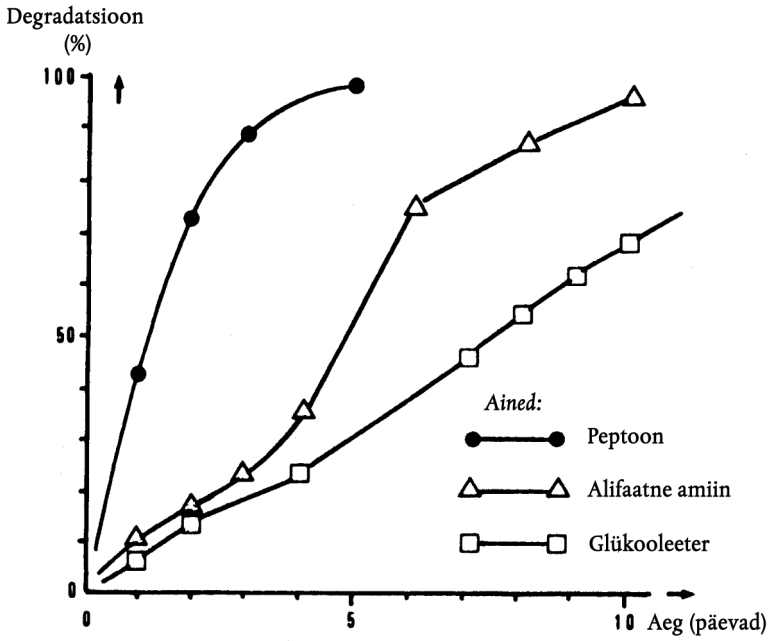
Orgaaniline ühend:	4-etoksübensoehape
Teoreetiline katsekontsentratsioon:	600 mg/l
Teoreetiline LOS:	390 mg/l
Inokulaat	... reoveepuhasti
Kontsentratsioon:	1 g kuivainet/l
Adaptatsiooni tase:	Pole kohandatud
Analüüs:	LOS-määramine
Proovi kogus:	3 ml
Kontrollaine:	Dietüleenglükool
Ühendi toksilisus:	Toksilised toimed puuduvad kontsentratsioonil alla 1 000 mg/l Kasutatud test: ensümaatiline test

Katseaeg	Kontrollaine				Uuritav aine		
	Tühi LOS (1) mg/l	LOS (1) mg/l	LOS puhas mg/l	Degradatsioon %	LOS (1) mg/l	LOS puhas mg/l	Degradatsioon %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 tundi	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 päev	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 päeva	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 päeva	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 päeva	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 päeva	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 päeva	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 päeva	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 päeva	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

(1) Kolme mõõtmise keskmine näitaja.

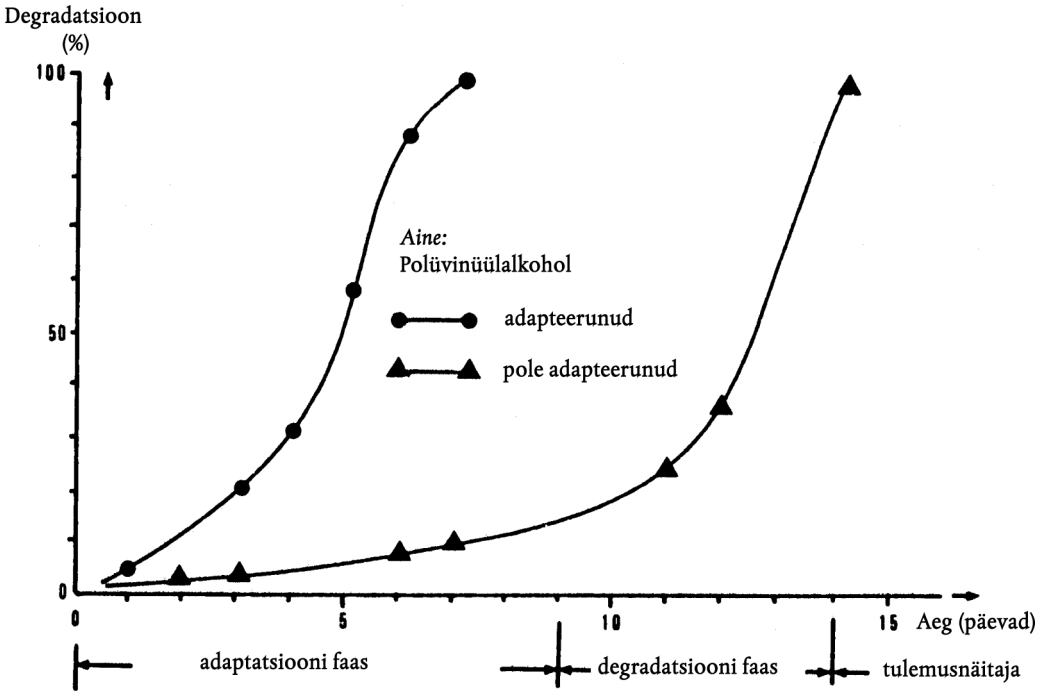
Joonis 1

Biodegradatsioonikõverate näited



Joonis 2

Aktiivmuda adaptatsiooni näited



BIODEGRADATSIOON

AKTIIVMUDA SIMULATSIOONITESTID

1. MEETOD

1.1. Sissejuhatus

1.1.1. *Üldmärkused*

Meetod sobib ainult nende orgaaniliste ainete puhul, mis katses kastutatava kontsentratsiooni juures:

— on veeslahustuvad katselahuste valmistamiseks vajalikus ulatuses,

— omavad katsetingimustel tühist küllastatud aururõhku,

— ei ole katsetingimustes bakterite suhtes pärssiva toimega.

Uuringutulemuste interpreteerimisel on kasulik teada uuritava materjali põhikomponentide kohta käivat informatsiooni. Seda eelkõige juhtudel, kui tulemused on väga väikesed või alammääralised.

Informatsioon aine toksilisuse kohta mikroorganismidesse võib olla kasulik väikeste tulemuste interpreteerimisel ja katseks sobiva kontsentratsiooni valimisel.

1.1.2. *Lõpliku biolagundatavuse määramine (LOS-/KHT-analüüs)*

Käesolev meetod on mõeldud lõpliku biolagundatavuse hindamiseks, määrates reoveepuhasti aktiivmudast uuritava ainevõi metaboliitide eliminatsiooni > 12 mg LOS/l (või ligikaudu 40 mg KHS/l); 20 mg LOS/l tundub olevat optimaalne. (LOS = lahustunud orgaaniline süsinik, KHT = keemiline hapnikutarve.)

Määrata tuleb uuritavast materjalist orgaanilise süsiniku sisaldus (või keemiline hapnikutarve).

1.1.3. *Primaarse biolagundatavuse määramine (erianalüüs)*

Meetodi eesmärgiks on reoveepuhasti aktiivmudas oleva uuritava aine primaarse biolagundatavuse määramine kontsentratsioonil ligikaudu 20 mg/l, kasutades spetsiifilist analüüsimeetodit (kasutada võib väiksemaid või suuremaid kontsentratsioone, kui analüüsimeetod ja toksilisuse näitajad seda võimaldavad). Nii on võimalik määrata uuritava aine primaarset biolagundatavust (eelühendi keemilise struktuuri kadumine).

Käesoleva meetodi eesmärgiks *ei ole* uuritava aine mineralisatsiooni määramine.

Vajalik on uuritava aine määramiseks sobiva analüüsimeetodi kasutamise võimalus.

1.2. Definitsioonid ja ühikud

1.2.1. *LOS-/KHT-analüüs*

Aine eliminatsiooni aste on antud järgmiselt:

$$ABH = \frac{T - (E - E_o)}{T} \times 100\ \% \qquad [1(a)]$$

kus:

DR = LOS- (või KHT-) eliminatsiooni aste protsentides uuritavale ainele vastavalt etteantud viibeaja juures,

T = uuritava aine kontsentratsioon sissevoolus mg-des LOS/l (või m-des KHT/l),

E = LOS- (või KHT-) kontsentratsioon katseseadmes mg-des LOS/l (või mg-des KHT/l),

E_O = LOS- (või KHT-) kontsentratsioon kontrollseadmes mg-des LOS/l (või mg-des KHT D/l).

Degradatsiooni väljendatakse LOS-i (või KHT) protsentuaalse eliminatsioonina uuritavale ainele vastavalt etteantud viibeaja juures.

1.2.2. *Erianalüüs*

Veefaasis (R_w) uuritava aine eliminatsioon protsentides on etteantud viibeaja juures esitatud järgmiselt:

$$R_W = \frac{C_I - C_O}{C_I} \times 100\ \% \qquad [1(b)]$$

kus:

C_I = uuritava aine kontsentratsioon katseseadme sissevoolus (mg ainet/l, määratuna erianalüüsiga),

C_O = uuritava aine kontsentratsioon katseseadme väljavoolus (mg ainet/l, määratuna erianalüüsiga).

1.3. **Võrdlusained**

Osadel juhtudel võib uue aine uurimisel olla kasu võrdlusainete kasutamisest. Siinjuures ei tooda aga ära spetsiifilisi võrdlusaineid.

1.4. **Uuringumeetodi põhimõtted**

Maksimaalse biolagundatavuse määramiseks kasutatakse paralleelselt kahte aktiivmuda katseseadet (OECD tõendav uuring või "poorne pott"). Ühe seadme sissevoolu (kunstlik või olmereovesi) lisatakse uuritavat ainet, teise seadmesse lastakse ainult reovett. Primaarse biolagundatavuse määramiseks erianalüüsidega, mis tehakse sissevoolust ja väljavoolust, kasutatakse ainult ühte seadet.

Väljavoolus mõõdetakse LOS- või KHT-kontsentratsiooni või määratakse aine kontsentratsioonid erianalüüside abil.

Uuritavast ainest tingitud LOS-i ei mõõdeta, vaid lihtsalt konstateeritakse selle olemasolu.

LOS- või KHT-mõõtmiste tegemisel eeldatakse, et katse- ja kontrollväljavoolude keskmiste kontsentratsioonide erinevused tulenevad lagundamata uuritavast materjalist.

Erianalüüside läbiviimisel võib mõõta eellasmolekuli kontsentratsioonierinevusi (primaarne biolagundamine).

Transinokulatsiooni protseduuri kasutades võib seadmeid lasta töötada "ühendatud seadmete" meetodil.

1.5. **Kvaliteedikriteeriumid**

Aine algkontsentratsioon sõltub läbiviidava analüüsi tüübist ja selle piirangutest.

1.6. **Uuringumeetodi kirjeldus**

1.6.1. *Ettevalmistused*

1.6.1.1. Aparatuur

Vaja on ühetüübiliste seadmete paari, välja arvatud juhul, kui tehakse erianalüüse.

Kasutada võib kahte tüüpi seadmeid:

OECD tõendav uuring

Seadmestik (lisa 1) koosneb kunstliku reovee säilitusnõust (A), doseerimispumbast (B), aeratsiooninõust (C), separaatorist (D), õhupumbast (E) aktiivmuda retsükleerimiseks ja töödeldud väljavoolu kogumisnõust (F).

Anumad (A) ja (F) peavad olema klaasist või sobivast plastikust ning mahutama vähemalt 24 liitrit vedelikku. Pump (B) peab tagama kunstliku reovee pideva voolu aeratsiooninõusse; kasutada võib mistahes sobivat süsteemi, mis kindlustab kunstliku reovee püsiva kontsentratsiooni ja sissevoolamise aeratsiooninõusse. Seadme normaalse töötamise käigus on separaatori (D) kõrgus fikseeritud niimoodi, et aeratsiooninõus sisalduva vedeliku maht on kolm liitrit. Aeraator (G) riputatakse nõusse (C) koonuse tipu juurde. Aeraatorit läbiva õhu hulka võib mõõta õhuvoolumõõtjaga.

Õhupump (E) on paigutatud nii, et aktiivmuda retsükleeritakse pidevalt ja korrapäraselt separaatorist aeratsiooninõusse (C).

"Poorne pott"

Poorne pott on konstrueeritud poorse polüetüleeni lehtedest (lehe paksus 2 mm, poori maksimaalne suurus 95 µm), millest on tehtud 14 cm läbimõõduga silindrid, mille põhjaks silindri suhtes 45° nurga all paiknev koonus (joonised 1 ja 2 liites 2). Poorne pott on mahutatud sobivast plastikust mitteläbilaskvasse anumasse läbimõõduga 15 cm ning mille äravooluava paikneb anuma silindrilise osa 17,2 cm kõrgusel. See määrab poti mahu – 3 liitrit. Sisemise anuma ülaosa ümber on sobivast plastikust jäik tugiring, nii et sisemise ja välimise anuma vahele jääb 0,5 cm väljavooluvee ruum.

Poorse poti võib paigaldada termostaatiliselt kontrollitava vesivanni põhja. Sisemise anuma põhjas on õhu ligipääsuava, millele paigaldatakse sobivad pihustid.

Anumad (A) ja (E) peavad olema klaasist või sobivast plastikust ning mahutama vähemalt 24 liitrit. Pump (B) peab tagama kunstliku reovee pideva voolu aeratsiooninõusse; kasutada võib mistahes sobivat süsteemi, mis kindlustab kunstliku reovee püsiva kontsentratsiooni ja sissevoolamise aeratsiooninõusse.

Tagavaraks on vaja poorse poti sisemisi anumaid, asendamaks töö käigus ummistunud potte. Ummistunud potte puhastatakse sukeldades nad 24 tunniks hüpokloriti lahusesse ja pestes neid seejärel hoolikalt kraanivee all.

1.6.1.2. Filtreerimine

Filtreerimisseade ja membraanfiltrid, mille poori suurus on 0,45 µm. Membraanfiltrid sobivad juhul, kui on kindel, et neist ei eraldu süsinikku ning neile ei adsorbeeru filtreerimise käigus ainet.

1.6.1.3. Reovesi

Kasutada võib nii kunstlikku reovett kui ka olmereovett.

Kunstliku reovee näiteid.

Lahustada 1 liitris kraanivees:

peptoon:	160 mg,
lihaekstrakt:	110 mg,
uurea:	30 mg,
NaCl:	7 mg,
$CaCl_2.2H_2O$:	4 mg,
$MgSO_4.7H_2O$:	2 mg,
K_2HPO_4:	28 mg.

Olmereovesi

Olmereovett tuleks koguda iga päev uuesti põhiliselt olmereovett töötleva biopuhasti eelsetitustanki ülevoolust.

1.6.1.4. Põhilahus uuritava ainega

Katseseadmesse lisamiseks valmistatakse uuritava aine lahus, nt 1 %line. Aine kontsentratsioon peab olema määratud selline, et vajaliku reoveele lisatava või (teise pumba abil) vahetult seadmesse lisatava vedeliku ruumala on teada.

1.6.1.5. Inokulaat

Märkus: olmereovee kasutamisel pole mõtet kasutada madala bakterite kontsentratsiooniga inokulaati, kuid võib kasutada aktiivmuda.

Kasutada võib mitmeid erinevaid inokulaate.

Kolm sobiva inokulaadi näidet:

a) Inokulaat sekundaarsest väljavoolust

See inokulaat varutakse kvaliteetsest sekundaarsest väljavoolust, mis on kogutud põhiliselt olmereovett töötlevast biopuhastist. Kogumise ja kasutamise vahel peab väljavooluvett hoidma aeroobsetes tingimustes. Inokulaadi valmistamiseks filtreeritakse kogutud materjal läbi jämeda filtri, esimesed 200 ml eemaldatakse. Filtraati hoitakse kasutamiseni aeroobsetes tingimustes. Inokulaati peab kasutama kogumise päeval. Inokuleerimiseks kasutatakse vähemalt 3 ml.

b) Segainokulaat

Inokulaat sekundaarsest väljavoolust:

Vt kirjeldust ülal.

Inokulaat mullast:

100 g aiamulda (fertiilset, mitte steriilset) suspendeeritakse 1 000 ml kloorivabas joogivees. (Väga suurt savi-, liiva- või huumusefraktsiooni sisaldavad mullad ei sobi.) Pärast läbisegamist lastakse suspensioonil 30 minutit settida. Supernatant filtreeritaks läbi jämeda filterpaberi. Esimesed 200 ml eemaldatakse. Filtraati hakatakse koheselt aereerima ning seda tehakse kasutamiseni. Inokulaati peab kasutama samal päeval, mil see koguti.

Inokulaat pinnaveest:

Inokulaadi järgmine osa võetakse mesosaproobsest pinnaveest. Materjal filtreeritakse läbi jämeda filtri, esimesed 200 ml eemaldatakse. Filtraati hoitakse aeroobsetes tingimustes kuni kasutamiseni. Inokulaati peab kasutama kogumise päeval.

Kolm osa inokulaati segatakse kokku võrdsetes ruumalades, segatakse hästi läbi, ning lõplik inokulaat võetakse sellest segust. Inokulaadiks kasutatakse vähemalt 3 ml.

c) Inokulaat aktiivmudast

Inokulaadina võib kasutada peamiselt olmereovett töötleva biopuhasti aeratsioonimahutist teatud mahus (mitte üle 3 l) võetud aktiivmuda (suspendeerunud tahke aine sisaldusega kuni 2,5 g/l).

1.6.2. *Protseduur*

Uuring viiakse läbi toatemperatuuril, mida hoitakse 18 ja 25 °C vahemikus.

Sobival juhul võib uuringut läbi viia madalamal temperatuuril (mitte alla 10 °C); juhul kui uuritav aine lagundub, pole edasine tegevus vajalik. Kui aine siiski ei lagune, tuleb katset läbi viia püsival temperatuuril 18 ja 25 °C vahel.

1.6.2.1. Sissetöötamise periood: muda teke/seadmete stabiliseerumine

Aktiivmuda kasvu/stabiliseerumise perioodil jõuab aktiivmuda tahke faasi kontsentratsioon ja seadmete töö rakendatud töötingimuste juures püsivasse olekusse.

Sissetöötamisperiood kestab uuritava aine lisamisest ajani, mil selle bioärastamise kiirus jõuab platooni (suhteliselt püsiva suuruseni). See ajavahemik ei tohi ületada kuut nädalat.

Hindamisperiood on kolmenädalane ajavahemik, alates ajast, mil uuritava aine bioärastamine jõuab suhteliselt püsiva ja tavaliselt kõrge väärtuseni. Ainete puhul, mida esimese kuue nädala jooksul lagundatakse vähe või üldse mitte, loetakse hindamisperioodiks järgnevad kolm nädalat.

Esiteks täidetakse ühe testi jaoks vajalik seade (vajalikud seadmed) sissevooluga, millesse on segatud inokulaat.

Siis pannakse tööle aeraator (OECD tõendava testi seadmete puhul ka õhupump (E)) ja doseerimisseade (B).

Sissevool ilma uuritava aineta peab läbima aeratsiooninõu (C) kiirusel üks liiter tunnis või pool liitrit tunnis, mis annab keskmiseks retentsiooniajaks kas kolm või kuus tundi.

Aeratsioonikiirust reguleeritakse selliselt, et anumas (C) sisalduva suspensiooni hapnikusisaldus on püsivalt vähemalt 2 mg/l.

Vahutamist peab sobivate vahenditega ära hoidma. Ei tohi kasutada aktiivmuda inhibeerivaid vahutamisvastaseid aineid.

Aeratsiooninõu (C) ülemise osa ümber (ning OECD tõendava testi seadmete kasutamise korral setitusnõu (D) põhja ja tsirkulatsiooniringi) kogunenud aktiivmuda peab viima tagasi vedelikku vähemalt kord päevas, harjamise või muu sobiva vahendi abil.

Kui muda ei setti, võib selle tihedust suurendada 5 % raudkloriidi lahuse lisamisega 2 ml annuste kaupa, vajadusel teha seda korduvalt.

Väljavoolu kogutakse nõusse (E või F) 20 kuni 24 tunni kestel, proov võetakse pärast põhjalikku segamist. Nõu (E või F) peab olema hoolikalt puhastatud.

Protsessi efektiivsuse jälgimiseks ja kontrollimiseks mõõdetakse (vähemalt kaks korda nädalas) kogunenud väljavoolu filtraadi keemiline hapnikutarve (KHT) või lahustunud orgaaniline süsinik (LOS). Sama näitaja määratakse filtreeritud sissevoolus (kasutades 0,45 µm poori suurusega membraanfiltrit, filtraadi esimesed (ligikaudu) 20 ml eemaldatakse).

KHT või LOS-i vähenemine peaks ühtlustuma, kui enam-vähem korrapärane päevane biolagundatavus on saavutatud.

Aeratsioonimahutis oleva aktiivmuda kuivainesisaldust määratakse kaks korda nädalas (grammides liitri kohta). Seadmed võivad töötada kahel viisil: 1) aktiivmuda kuivainesisaldust mõõdetakse kaks korda nädalas ning kui see ületab 2,5 g/l, peab liigmuda eemaldama, või 2) eemaldatakse iga päev igast potist 500 ml vedelikku, et keskmiseks aktiivmuda viibeajaks kujuneks kuus päeva.

Kui mõõdetud ja hinnatud parameetrid (protsessi efektiivsus (KHT- või LOS-ärastamisena), muda kontsentratsioon, muda settivus, väljavoolu hägusus jne) on piisavalt püsivad, võib ühe seadme sissevoolu lisada uuritavat ainet, järgides punkti 1.6.2.2.

Teise võimalusena võib uuritava aine lisada muda kasvuperioodi alguses, eriti siis, kui muda kasutatakse inokulaadina.

1.6.2.2. Uuringuprotseduur

Säilitatakse sissetöötamisperioodi töötingimusi ning lisatakse piisavas koguses uuritava materjali põhilahust (ligikaudu 1 %) katseseadme sissevoolu, nii et reovees saavutatakse testitava materjali soovitud kontsentratsioon (ligikaudu 10 kuni 20 mg LOS-i liitris või 40 mg KHT-d liitris). Selleks võib reoveele iga päev põhilahust juurde segada või kasutada eraldi pumpamissüsteemi. Soovitud kontsentratsioonini võib jõuda seda pidevalt kasvatades. Juhul kui uuritav aine ei oma aktiivmudale toksilist mõju, võib testida ka kõrgemaid kontsentratsioone.

Teise seade toiteks kasutatakse ainult sissevoolu, millesse muid aineid pole lisatud. Analüüside jaoks võetakse sobivas ruumalas väljavoolu ning filtreeritakse see läbi membraanfiltrite (0,45 μm), esimesed (ligikaudu) 20 ml filtraati eemaldatakse.

Filtreeritud proove peab analüüsima samal päeval, vastasel juhul peab neid säilitama mingil sobival meetodil, nt kasutades 0,05 ml 1 % elavhõbedakloriidi ($HgCl_2$) lahust filtraadi iga 10 ml kohta, või säilitades proove 2 kuni 4 °C juures kuni 24 tundi, või alla –18 °C juures pikemate ajavahemike vältel.

Sissetöötamisaeg koos uuritava aine lisamisega ei tohiks ületada kuut nädalat ning hindamisperiood ei tohiks olla lühem kui kolm nädalat, st lõpliku tulemuse arvestamiseks peaks kasutama umbes 14 kuni 20 määratud proovi.

Seadmete seostamise meetod

Seadmete seostamine saavutatakse, kui vahetatakse kord päevas 1,5 liitrit vedelikusegu (sh aktiivmuda) kahe seadme aktiivmuda aeratsiooninõude vahel. Tugevalt absorbeerivate testmaterjalide puhul võetakse setitusnõu pinnalt 1,5 l supernatanti ning valatakse see teise seadme aktiivmudanõusse.

1.6.2.3. Analüüs

Jälgides uuritava aine käitumist võib läbi viia kahte tüüpi analüüse:

LOS ja KHT

LOS-kontsentratsioonide analüüse tehakse kahekordselt süsinikuanalüsaatoriga ja/või analüüsitakse KHT-d vastavalt viitele (2).

Erianalüüsid

Uuritava aine kontsentratsioone mõõdetakse sobiva analüüsimeetodiga. Võimaluse korral tuleb kindlaks teha mudale absorbeerunud ained.

2. ANDMED JA HINDAMINE

2.1. Ühendatud seadmete meetod

"Ühendatud seadmete meetodi" kasutamisel arvutatakse päevane aine bioärastamise hulk (ABH) ühes päevas vastavalt punktile 1.2.1.

Päevased aine bioärastamise hulgad ABH teisendatakse ABHc-ks transinokulatsiooniprotseduurist tingitud materjali ülekandmise jaoks, kolmetunnise keskmise retentsiooniaja puhul vastavalt võrrandile [2], kuuetunnise keskmise retentsiooniaja puhul vastavalt võrrandile [3].

$$ABHc = \frac{8}{7}\ ABH - \frac{100}{7} \quad [2]$$

$$ABHc = \frac{4}{3}\ ABH - \frac{100}{3} \quad [3]$$

Arvutatakse ABHc väärtuste seeriate keskväärtus ning lisaks standardhälve vastavalt valemile [4]

$$s_{ABHc} = \sqrt{\frac{\Sigma_{i=1}^{n}\ \left(\overline{ABH} - ABHc_i\right)^2}{n - 1}} \quad [4]$$

kus:

S_{ABHc} = ABHc väärtuste seeria standardhälve,

$\overline{ABH}$ = ABHc väärtuse keskväärtus,

n = mõõtmiste arv.

ABHc seeriate need väärtused, mis teistest tugevasti erinevad, jäetakse arvutustest välja mõne sobiva statistilise protseduuri abil, nt Nalimov (6), ning arvutatakse ABHc andmetest uuesti keskmine ja standardhälve 95 % usaldusnivool.

Lõplik tulemus arvutatakse vastavalt valemile [5]

$$ABHc = \overline{ABH} \pm \frac{t_{n-1};\alpha}{\sqrt{n}\ s_{ABHc}} \quad [5]$$

kus:

$t_{n-1};\alpha$ = tabelist leitud t-statistiku väärtus n-i E ja E_O väärtuste paaride juures, 95 % tõenäosusega P = 95 % (P = 1–α, kus α on olulisuse nivoo).

Tulemus esitatakse keskmisena koos 95 % tolerantsipiiridega, vastava standardhälbega ja ABH andmestikus, kust tugevasti erinevad andmed on välja jäetud, sisalduvate andmete arvuga ning nende väljajäetute arvuga, nt

ABHc = 98,6±2,3 % LOS-bioärastamisest,

s = 4,65 % LOS-bioärastamisest,

n = 18,

x = välja jäetud tugevasti erinevate mõõtmiste arv.

2.2. **Seostamata seadmete meetod**

Seadmete töötamist võib kontrollida järgmiselt:

$$\text{ärastamisprotsent} = \frac{\text{reo KHT või LOS- jäätmete KHT või LOS}}{\text{reo KHT või LOS}} \times 100$$

Päevased bioärastamishulgad võib esitada graafiliselt näitamaks võimalikke muutumissuundasid, nt kohandumises.

2.2.1. *KHT-/LOS-määramiste kasutamine*

ABH-i päevane bioärastamishulk arvutatakse vastavalt punktile 1.2.1.

Arvutatakse ABH väärtuste seeriate keskväärtus, lisaks arvutatakse standardhälve järgnevalt:

$$s_{ABH} = \sqrt{\frac{\Sigma_{i=1}^{n}\ \left(\overline{ABH} - ABH_i\right)^2}{n - 1}} \quad [6]$$

kus:

S_{ABH} = ABH_i-i väärtuste seeriate standardhälve,

$\overline{ABH}$ = ABH_i-i väärtuste seeriate keskväärtus,

n = määramiste arv.

ABH seeriate need väärtused, mis teistest tugevasti erinevad, jäetakse arvutustest välja mõne sobiva statistilise protseduuri abil, nt Nalimovi järgi (6), ning arvutatakse ABH andmetest uuesti keskmine ja standardhälve 95 % usaldusnivool.

Lõplik tulemus arvutatakse vastavalt valemile [7]:

$$ABH = \overline{ABH} \pm \frac{t_{n-1};\alpha}{\sqrt{n}\, s_{ABH}} \quad [7]$$

kus:

$t_{n-1};\alpha$ = tabelist leitud t-statistiku väärtus n-i E ja E_O väärtuste paaride juures, 95 % tõenäosusega P = 95 % (P = 1–α, kus α on olulisuse nivoo).

Tulemus esitatakse keskväärtusena koos 95 % tolerantsipiiridega, vastava standardhälbega ja ABH andmestikus, kust tugevasti erinevad andmed on välja jäetud, sisalduvate andmete arvuga ning väljajäetute arvuga, näiteks

ABH = (98,6±2,3) % LOS-bioärastamisest,

s = 4,65 % LOS-bioärastamisest,

n = 18,

x = väljajäetud tugevasti erinevate mõõtmiste arv.

2.2.2. *Spetsiifiliste analüüside kasutamine*

Uuritava aine elimineerumine protsentides vesifaasist (R_W) arvutatakse vastavalt punktile 1.2.2.

3. ARUANNE

3.1. Uuringu raport

Uuringuraport võiks võimalusel sisaldada järgnevat:

— liites 3 antud ankeedivormi, mis näitab uuringu töötingimusi,

— millist aparatuuri kasutati (kas OECD tõendava testi või poorse poti aparatuuri),

— milline töömeetod valiti: ühendatud seadmete meetod või mitte,

— millist reovett kasutati: kunstlikku või olmereovett, viimasel juhul märkida ära proovi võtmise koht ja kuupäev,

— millist inokulaati kasutati, proovi tegemise koht ja kuupäev,

— juhul kui viidi läbi spetsiifilisi analüüse, lisada analüüsimeetodi kirjeldus,

— joonis, millel on KHT- või LOS-bioärastamine ajas, sealhulgas sissetöötamisperiood ja hindamisperiood,

— analüütiline uuritava aine regeneratsioon põhilahuse KHT või LOS-ina,

— spetsiifiliste analüüside läbiviimise korral teha joonis, millel on protsentides näidatud uuritava aine bioärastamine vesifaasist ajas (sissetöötamis- ja hindamiseperioodil),

— hindamisperioodi tulemuste põhjal arvutatakse uuritava aine LOS- või KHT-bioärastamise keskväärtus ja standardhälve, seda siis kui esineb püsiv uuritava aine ärastamine või püsiv töötlemisperiood,

— graafikuna aktiivmuda kontsentratsiooni muutus ajas,

— märkusi aktiivmuda kohta (liigmuda eemaldamise, suurte koguste esinemine, $FeCl_3$, jne)

— uuringus kasutatud aine kontsentratsioon,

— mistahes tulemused, mis on saadud muda analüüsimisel,

— kogu uuritava aine (ning ka võrdlusaine, kui seda kasutati) kohta saadud info ja katsetulemused,

— teaduslik põhjendus mistahes muudatustele, mis protseduuris tehtud.

3.2. **Tulemuste tõlgendamine**

Uuritava aine vähene bioärastamine vesifaasist võib tuleneda uuritava aine inhibeerivast toimest mikroorganismidele. See mõju võib avalduda ka muda lüüsumise ja kaona, mille tulemusena tekib hägune supernatant, ning ka katsepuhasti KHT- (või LOS-) bioärastamise efektiivsuse langusena.

Füüsikalis-keemiline adsorptsioon võib samuti mõnikord oluline olla. Erinevusi molekulidele avalduva bioloogilise toime ja füüsikalis-keemilise adsorptsiooni vahel saab näidata muda analüüsil pärast piisavat desorptsiooni.

Juhul kui on vaja eristada biolagundatavust (või osalist biolagundatavust) ja adsorptsiooni, on vajalik läbi viia edasisi uuringuid.

Neid võib teha mitmel eri viisil, kuid kõige kindlama tulemuse saab kasutades inokulaadina supernatanti baastestis (eelistatult respiromeetrilist testi).

Juhul kui täheldatakse kõrgeid KHT- või LOS-ärastamise väärtusi, tuleneb see biolagunemisest, samas madalate KHT- või LOS-ärastamise väärtuste puhul on biolagundamine eristamatu eliminatsioonist. Näiteks kui lahustuval ühendil on kõrge adsorptsioonikonstant 98 % ja ülearuse jääkmuda tekkimise kiirus on 10 % päevas, on võimalik kuni 40 % elimineerumine; ning kui ülearuse jääkmuda tekkimise kiirus on 30 %, võib adsorptsioonist ja koos ülearuse jääkmudaga eemaldumisest tulenev elimineerumine ulatuda 65 %ni (4).

Spetsiifiliste analüüside kasutamisel tuleb pöörata tähelepanu aine struktuuri ja kasutatava analüüsi vahekorrale. Sel juhul ei ole võimalik jälgitud nähtust tõlgendada aine mineraliseerumisena.

4. **VIITED**

1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 303 A*, Decision of the Council C(81) 30 final.

2) Annex V C9 Degradation Test – Chemical Oxygen Demand, Commission Directive 84/449/EEC, *Official Journal of the European Communities*, No L 251, 19.9.1984.

3) Painter, H. A., King, E. F., *WRC Porous-Pot method for assessing biodegradability*, Technical Report TR70, June 1978, Water Research Centre, United Kingdom.

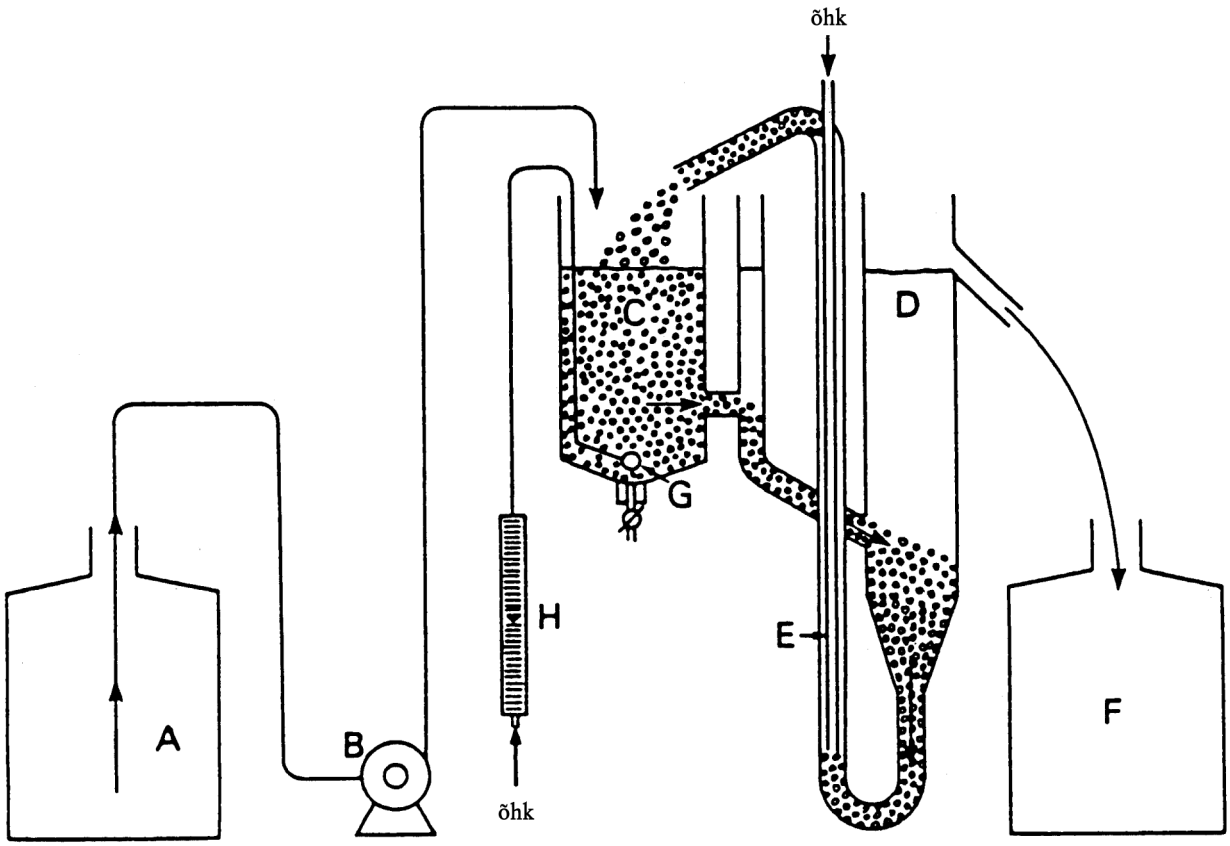
4) Wierich, P., Gerike, P., The fate of soluble, recalcitrant, and adsorbing compounds in sludge plants, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 5, No 2, June 1981, pp. 161 to 171.

5) Council Directives 82/242/EEC and 82/243/EEC, *Official Journal of the European Communities*, No L 109, 22.4.1982, amending Council Directives 73/404/EEC and 73/405/EEC on biodegradability of detergents, *Official Journal of the European Communities*, No L 347, 17.12.1973.

6) Streuli, H., Fehlerhafte Interpretation und Anwendung von Ausreißertests, insbesondere bei Ringversuchen zur Überprüfung analytisch-chemischer Untersuchungsmethoden, *Fresenius-Zeitschrift für Analytische Chemie*, 303 (1980), pp. 406 to 408.

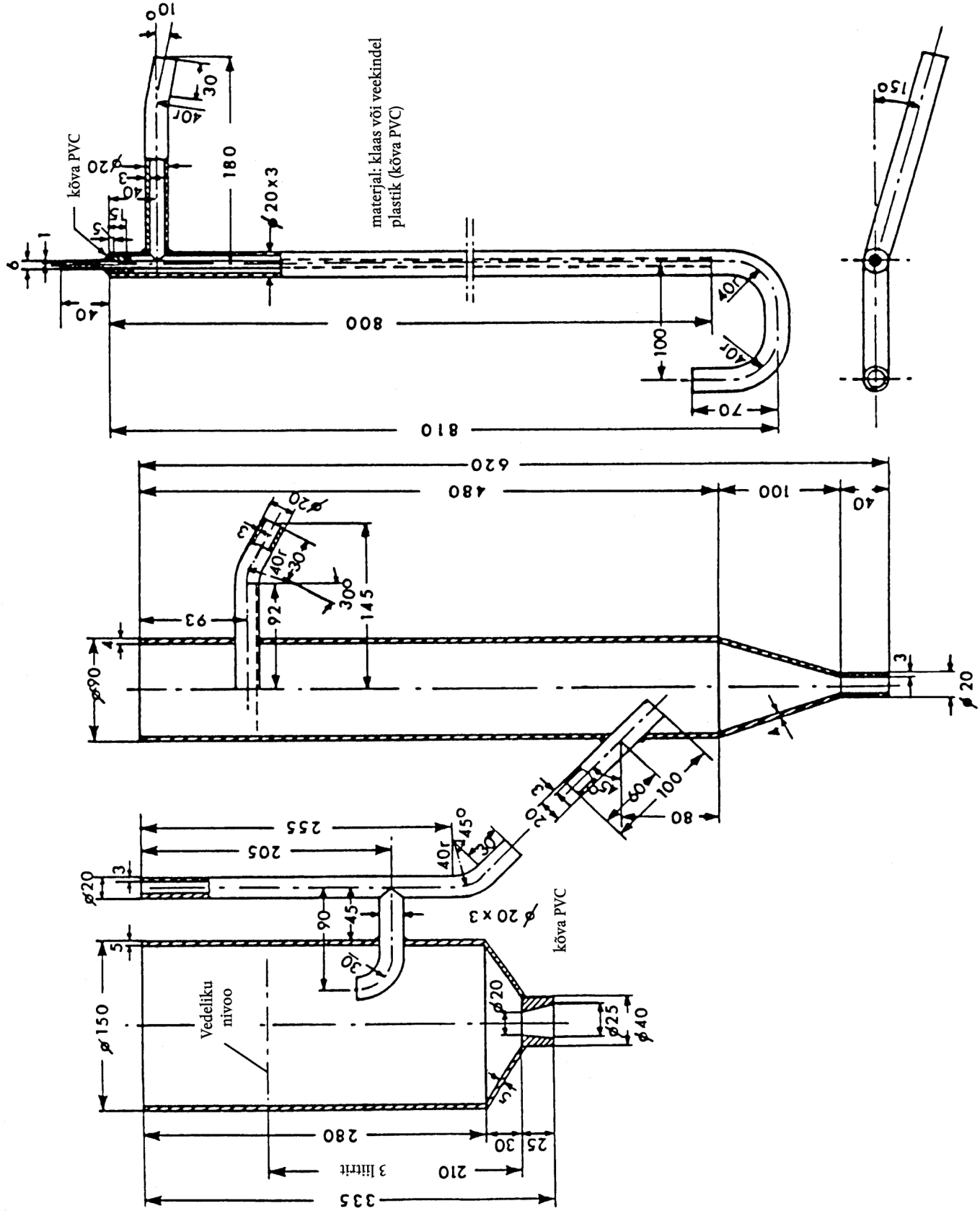
Liide 1

Joonis 1



Märgistus: A: säilitusnõu;
B: doseerimispump;
C: aeratsioonimahuti (mahtuvusega 3 l);
D: separaator;
E: õhupump;
F: kogumisnõu;
G: aeraator;
H: õhuvoolumõõtja (valitav).

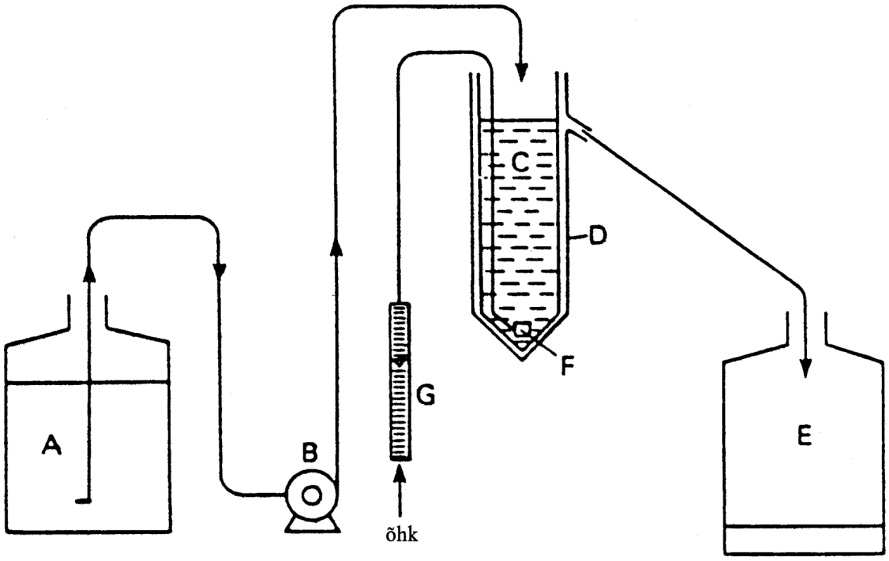
Joonis 2


materjal: klaas või veekindel plastik (kõva PVC)
kõva PVC
Vedeliku nivoo
3 liitrit

Liide 2

Joonis 1

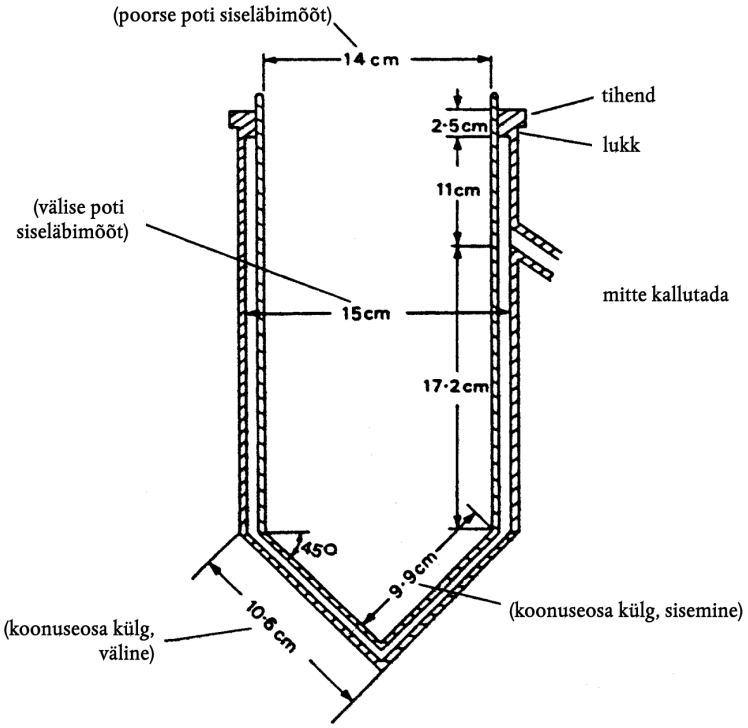
Seadmestik biolagundatavuse hindamiseks



Tähistused: A: säilitusnõu;
B: doseerimispump;
C: poorne aeratsioonimahuti;
D: veekindla väliskihiga anum;
E: väljavoolu kogumisnõu;
F: difuusor-kivi aeraator;
G: rotameeter (valitav).

Joonis 2

Kolmeliitrise "poorse poti" aeratsiooninõu osad



Liide 3

Aktiivmuda simulatsiooni testi töötamistingimused

Kontrollida igas grupis

Aparatuur

OECD tõendamine ☐
Poorne pott ☐

Töömeetod

Üksik seade ☐
Ühendatud seadmed ☐
Ühendamata seadmed ☐

Transinokulatsioon

Puudub ☐
Aktiivmuda ☐
Supernatant ☐

Keskmine retentsiooniaeg

Kolm tundi ☐
Kuus tundi ☐

Põhitoitaine

Olmereovesi ☐
Kunstlik reovesi ☐

Inokulaat

Sekundaarne väljavool ☐
Komposiit ☐
Aktiivmuda ☐

Uuritava materjali lisamine

Alates algusest ☐
Järk-järgult suurendades ☐
Pärast muda settimist ☐

Analüüs

Spetsiifiline ☐
LOS ☐
KHT ☐

BIODEGRADATSIOON

AKTIIVMUDA RESPIRATSIOONI PÄRSSIMISE TEST

1. MEETOD

1.1. Sissejuhatus

Kirjeldatud meetodiga määratakse uuritava aine mõju mikroorganismidele, mõõtes respiratsiooni intensiivsust uuritava aine erinevate kontsentratsioonide juures.

Selle meetodi eesmärgiks on saada kiire skriiningumeetod, millega kindlaks teha aineid, mis võivad kahjustavalt mõjuda aeroobsetele reoveepuhastitele ja määrata sobivaid mitte-inhibeeriva toimega uuritava aine kontsentratsioone, mida saaks biodegradatsiooni testides kasutada.

Lõplikule testile eelneb sobiva vahemiku leidmise test. Selle tulemusena saab informatsiooni kontsentratsioonivahemike kohta, mida põhitestis kasutada.

Uuringusse kaasatakse kaks kontrolli ilma uuritava aine sisalduseta, üks lisatakse testiseeria alguses ja teine lõpus. Samuti tuleb võrdlusainega kontrollida kõiki aktiivmuda partiisid.

See meetod on sobivaim ainete puhul, mis seoses oma veeslahustuvuse ja väikese lenduvusega jäävad tõenäoliselt vette.

Uuritavas keskkonnas vähese lahustuvusega ainete puhul ei ole võimalik EC_{50} määrata.

Hapniku omastamisel põhinevad tulemused võivad anda ekslikke tulemusi, kui uuritava aine puhul esineb kalduvus vabastavale oksüdatiivsele fosforülatsioonile.

Enne uuringu läbiviimist on kasulik teada järgmisi andmeid:

— veeslahustuvus,

— küllastunud aururõhk,

— struktuurvalem,

— uuritava aine puhtusaste.

Soovitused

Aktiivmuda võib sisaldada potentsiaalselt patogeenseid organisme, mistõttu tuleb seda käsitseda ettevaatlikult.

1.2. Definitsioonid ja ühikud

Respiratsiooni intensiivsus on hapniku tarbimine aeroobses mudas olevate reovee mikroorganismide poolt, mida väljendatakse tavaliselt O_2/mg muda kohta ühes tunnis.

Uuritava aine kindla kontsentratsiooni inhibeeriva toime arvutamiseks väljendatakse respiratsiooni intensiivsust kahe respiratsiooni intensiivsuse keskmise kontrollnäitaja protsendina:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{Rc_1 + Rc_2}\right) \times 100 = \text{inhibitsiooni protsent}$$

kus:

R_s = hapniku tarbimine katseaine uuritava kontsentratsiooni juures,

Rc_1 = hapniku tarbimine, kontroll 1,

Rc_2 = hapniku tarbimine, kontroll 2.

EC_{50} on käesoleva meetodi puhul uuritava aine kontsentratsioon, mille juures on respiratsiooni intensiivsus 50 % kontrolli puhul saavutatust kirjeldatud tingimuste juures.

1.3. **Võrdlusained**

Võrdlusainena soovitatakse kasutada tuntud respiratsiooni inhibeerivat ainet 3,5-dikloorfenooli ja seda määrata EC_{50} iga aktiivmuda partii puhul, et kontrollida, kas muda tundlikkus on normaalne.

1.4. **Uuringumeetodi põhimõte**

Kunstliku muda standardsisaldusega aktiivmudas mõõdetakse respiratsiooni intensiivsust 30minutilise või kolmetunnise kokkupuuteaja järel (või mõlema järel). Samuti mõõdetakse sama aktiivmuda respiratsiooni intensiivsus erinevas kontsentratsioonis uuritava aine juuresolekul muidu samasuguste tingimuste juures. Uuritava aine pärssivat toimet kindla kontsentratsiooni juures väljendatakse protsendina kahe kontrolli keskmisest respiratsiooni intensiivsuse näitajast. EC_{50} näitaja arvutatakse erinevate kontsentratsioonide juures saadud näitajate põhjal.

1.5. **Kvaliteedikriteeriumid**

Uuringu tulemused kehtivad, kui:

— erinevus kahe hingamise intensiivsuse kontrollnäitaja vahel on kuni 15 %,

— 3,5-dikloorfenooli EC_{50} (30 minutit ja/või kolm tundi) on ettenähtud vahemikus 5–30 mg/l.

1.6. **Uuringumeetodi kirjeldus**

1.6.1. *Reagendid*

1.6.1.1. Uuritava ainega lahused

Uuritavat ainet sisaldavad lahused valmistatakse vahetult uuringu alguses põhilahusega. Kui järgitakse allpool kirjeldatud protseduuri, on põhilahuse sobivaks kontsentratsiooniks 0,5 g/l.

1.6.1.2. Kontrollaine lahus

3,5-dikloorfenooli lahuse saab näiteks valmistada 0,5 g 3,5-dikloorfenool lahustamisel 10 ml 1M NaOH lahuses, saadud lahus lahjendatakse ligikaudu 30 ml destilleeritud veega, lisades samaaegsel segamisel 0,5M H_2SO_4 kuni sademe tekke alguseni – vajalik võib olla ligikaudu 8 ml 0,5M H_2SO_4 lahuse lisamine – ja lõpuks lahjendatakse segu destilleeritud veega kuni ühe liitrini. Saadud lahuse pH peaks olema vahemikus 7 kuni 8.

1.6.1.3. Kunstlik reovesi

Kunstlikul reoveel põhinev sööde valmistatakse järgnevas koguses ainete lahustamisel ühes liitris vees:

— 16 g peptooni,

— 11 g lihaekstrakti,

— 3 g kusihapet,

— 0,7 g NaCl,

— 0,4 g $CaCl_2.2H_2O$,

— 0,2 g $MgSO_4.7H_2O$,

— 2,8 g K_2HPO_4.

Märkus 1: äratoodud kunstlik reovesi on 100 korda kontsentreeritum, kui kirjeldatud OECD tehnilise raporti peatükis "Soovitatud meetodid sünteetilistes detergentides kasutatavate surfaktantide biodegradeeruvuse kindlaks tegemiseks" (11. juuni 1976), lisatud on kaaliumdivesinikfosfaati.

Märkus 2: kui valmistatud lahust ei kasutata koheselt, tuleb seda säilitada pimedas ruumis temperatuuril 0–4 °C mitte kauem kui üks nädal tingimuste juures, mis ei põhjusta muutusi aine koostises. Samuti võib lahust enne säilitamist steriliseerida või lisada peptoon ja lihaekstrakt vahetult enne testi läbiviimist. Enne kasutamist tuleks lahust põhjalikult segada ja selle pH kohandada vastavalt nõuetele.

1.6.2. *Aparatuur*

Mõõteaparatuur: täpselt samasugune ülesehitus ei ole vajalik. Siiski peaks aparaadil olema pealispind ja sond peaks tihedalt sobituma mõõtekolbi kaelaossa.

Vajalik on tavaline laborivarustus ja eelkõige järgmised seadmed:

— mõõteaparatuur,

— aeratsiooniseade,

— pH-elektrood ja mõõtmisvarustus,

— O_2-elektrood.

1.6.3. *Inokulaadi valmistamine*

Testi bakteriaalse inokulaadina kasutatakse aktiveeritud reovett, mis on pärit peamiselt olmereovett töötlevatest puhastussüsteemidest.

Vajadusel võib suuri osakesi eemaldada sadestamise teel, kui jätta lahus lühiajaliselt (näiteks 15 minutiks) seisma ja dekanteerida ülemine väiksemate osakestega kiht kasutamiseks. Teise võimalusena võib reovett segada blenderiga mõne sekundi jooksul.

Kui kahtlustatakse inhibeeriva toimega lisandite juuresolekut, tuleks muda loputada kraanivee või isotoonilise lahusega. Pärast tsentrifuugimist supernatant eemaldatakse (seda protseduuri korratakse kolm korda).

Väike kogus muda kaalutakse välja ja kuivatatakse. Saadud tulemusest võib arvutada märja muda koguse, mida tuleb segada veega, et vedelikusegus suspendeeritud tahke aine kontsentratsioon oleks vahemikus 2–4 g/l. Sellisel juhul saavutatakse eksperimentaaltingimustes kontsentratsioonivahemik 0,8–1,6 g/l, tingimusel et järgitakse allpool soovitatud protseduuri.

Kui muda ei saa kasutada selle kogumise päeval, lisatakse 50 ml sünteetilist muda igale aktiivmuda kogusele, mis on valmistatud nagu eespool kirjeldatud; seda aereeritakse seejärel läbi öö 20 ± 2 °C ning aereerimist jätkatakse kogu päeva. Enne kasutamist tuleb kontrollida pH-d ja vajadusel kohandada väärtuseni 6 kuni 8. Aktiivmuda kuivaine sisaldus tuleks kindlaks määrata, nagu eelnenud lõigus kirjeldatud.

Kui järjestikustel päevadel (maksimaalselt neli päeva) on vaja kasutada sama muda partiid, lisatakse iga tööpäeva lõpus veel 50 ml kunstlikku reovett ühe liitri muda kohta.

1.6.4. *Testi läbiviimine*

Kestus/kokkupuute aeg:	30 minutit ja/või kolm tundi, kogu aja vältel rakendatakse aereerimist
Vesi:	joogivesi (vajadusel deklooritud)
Õhu lisamine:	puhas, õlivaba õhk. Õhuvool 0,5–1 l/minutis
Mõõteaparatuur:	lamedapõhjaline konteiner, näiteks BOD-konteiner
Hapnikumõõtur:	sobiv hapnikuelektrood koos registreerijaga
Toitelahus:	sünteetiline reovesi (vt eestpoolt)
Uuritav aine:	uuritav lahus valmistatakse värskena, vahetult enne testi alustamist
Võrdlusaine:	näiteks 3,5-dikloorfenool (vähemalt kolme erinevat kontsentratsiooni)
Kontrollid:	inokuleeritud proov, mis ei sisalda uuritavat ainet
Temperatuur:	20±2 °C.

Järgmiselt on kirjeldatud soovitatavad katseprotseduurid, mida võib järgida nii uuritava kui ka võrdlusaine puhul kolmetunnise kokkupuuteperioodi vältel:

Kasutatakse mitmeid anumaid (näiteks üheliitriseid mõõteanumaid).

Kasutada tuleks vähemalt viit kontsentratsiooni, mis erineksid mitte rohkem kui 3,2 korda.

Ajahetkel "0" lahustatakse 16 ml kunstliku reovee toitelahust veega kuni 300 ml-ni. Lisatakse 200 ml mikrobiaalset inokulaati ja saadud segu (500 ml) valatakse esimesse anumasse (esimene kontroll C_1).

Katsenõusid tuleb pidevalt aereerida, et lahustunud O_2 väärtus ei langeks alla 2,5 mg/l ja et vahetult enne hingamissageduse mõõtmist oleks O_2 kontsentratsioon ligikaudu 6,5 mg/l.

Ajahetkel “15 minutit” (15 minutit on suvaline, kuid usaldusväärne ajavahemik) korratakse eelpool kirjeldatut. Erinevuseks on 100 ml uuritavat ainet sisaldava põhilahuse lisamine 16 ml kunstlikku reovette enne vee lisamist (lahjendamiseks 300 ml-ni) ja mikrobiaalsesse inokulaati, et saada lõppkoguseks 500 ml. Saadud segu valatakse teise anumasse ja aereeritakse nagu eespool kirjeldatud. Seda protsessi korratakse 15minutiliste intervallide järel erinevate uuritavat ainet sisaldava põhilahuse kogustega, et saada anumad uuritava aine erinevate kontsentratsioonidega. Lõpuks valmistatakse teine kontroll (C_2).

Kolme tunni möödumisel registreeritakse pH, esimese anuma sisust võetud korralikult segatud proov valatakse mõõteaparaati ja respiratsiooni intensiivsust mõõdetakse kuni 10 minuti vältel.

Sama mõõtmist korratakse iga nõu sisuga 15minutiliste intervallide järel, sellisel juhul on iga anuma puhul kokkupuuteaeg kolm tundi.

Võrdlusainet analüüsitakse iga partii bakteriaalse inokulaadiga samal viisil.

Kui mõõtmisi tuleb teha 30 minuti möödumisel kokkupuutest, võib olla vajalik teistsugune režiim.

Kui on vaja mõõta hapnikutarvet, valmistatakse ette uued anumad, mis sisaldavad uuritavat ainet, kunstlikku reovett ja vett, kuid mitte aktiivmuda. Hapniku tarbimist mõõdetakse ja registreeritakse pärast 30minutilist ja/või kolmetunnilist aereerimist (kokkupuuteaeg).

2. ANDMED JA HINDAMINE

Respiratsiooni intensiivsust arvutatakse registreerija näidu vahemikus ligikaudu 6,5 mg O_2/l kuni 2,5 mg O_2/l või 10minutilises perioodis, kui respiratsiooni intensiivsus on väike. Respiratsiooni kõvera osa, mille ajal respiratsiooni intensiivsust mõõdetakse, peab olema lineaarne.

Kui kahe kontrolli respiratsiooni intensiivsuse näitajate omavahelised erinevused ei ole 15 % sees või ei ole võrdlusaine EC_{50} (30 minutit ja/või kolm tundi) aktsepteeritud vahemikus (5–30 mg/l 3,5-dikloorfenooli), on test kehtetu ja seda tuleb korrata.

Iga uuringulahuse kontsentratsiooni kohta arvutatakse protsentuaalne inhibeerumine (vt 1.2). Graafiku teljestikule kantakse protsentuaalne inhibeerumine suhtes kontsentratsiooniga ning saadud EC_{50} väärtus.

Standardprotseduuride kasutamisel saab EC_{50} väärtuste kohta määrata 95 % usalduspiirid.

3. ARUANNE

3.1. Uuringu raport

Uuringu raport peaks võimaluse korral sisaldama järgnevat:

— uuritav aine: keemilised omadused,

— uuringu süsteem: päritolu, kontsentratsioon ja võimalikud aktiivmuda eeltöötlused,

— katsetingimused:

  — reaktsioonisegu pH enne hingamise mõõtmist,

  — katsetemperatuur,

  — katse kestus,

  — võrdlusaine ja selle mõõdetud $EC_{50,}$

  — abiootiline hapniku omastamine (kui esineb),

— tulemused:

  — kõik mõõdetud andmed,

  — inhibeerumise kõver ja EC_{50} arvutusmeetod,

  — EC_{50} ja võimaluse korral 95 % usalduspiirid, EC_{20} ja EC_{80},

  — kõik jälgimised ja võimalikud hälbed, mis võiksid tulemusi mõjutada.

3.2. Andmete tõlgendamine

EC_{50} väärtust tuleks pidada vaid viiteks võimalikule uuritava aine toksilisusele kas reoveepuhastist saadud aktiivmudas või reovees sisalduvatesse mikroorganismidesse, kuna keskkonnas asetleidvaid keerukaid koosmõjusid ei saa laboritingimustes täpselt jäljendada. Lisaks võivad ka uuritavad ained põhjustada ebatüüpilisi inhibeerumise kõveraid, kuna võivad pärssivalt mõjuda ammoniaagi oksüdatsioonile. Eeltoodust lähtuvalt tuleks selliseid kõveraid tõlgendada ettevaatusega.

4. **VIITED**

1) International Standard ISO 8192-1986.

2) Broecker, B., Zahn, R., *Water Research* 11, 1977, p. 165.

3) Brown, D., Hitz, H. R., Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 1981, p. 245.

4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), *Recommended Method No 103*, also described by:

5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, 1976, p. 80.

6) Schefer, W., *Textilveredlung* 6, 1977, p. 247.

7) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 209*, Decision of the Council C(81) 30 final.

BIODEGRADATSIOON

MODIFITSEERITUD SCAS TEST

1. MEETOD

1.1. Sissejuhatus

Meetodi eesmärgiks on hinnata veeslahustuvate, mittelenduvate orgaaniliste ainete võimalikku lõpp-biodegradeerumist kokkupuutel suhteliselt suurte mikroorganismide kontsentratsioonidega pika aja jooksul. Mikroorganismide elusolek säilitatakse selles perioodis, toites aktiivmuda iga päev setitatud reovee lisamisega. (Nädalavahetuse vajaduste katmiseks võib reovett säilitada temperatuuril 4 °C. Teise võimalusena võib kasutada OECD kunstlikku reovett.)

Võimalik on füüsikalis-keemiline adsorptsioon suspendeeritud kuivainele, mida tuleks tulemuste interpreteerimisel arvestada (vt 3.2).

Seoses vedela faasi pika viibeaja perioodiga (36 tundi) ja vahepealse toitainete lisamisega ei jäljenda test neid tingimusi, mis tekivad reoveepuhastis. Erinevate uuritavate ainetega saadud tulemused viitavad sellele, et testi biodegradatsioonivõime on suur.

Testis tekitatud tingimused on äärmiselt soodsad uuritavat ühendit degradeerivate mikroorganismide valikuks ja/või adaptatsiooniks. (Protseduuri võib samuti kasutada aklimatiseeritud inokulaadi tekitamiseks, mida kasutada teistes testides.)

Selle meetodi puhul kasutatakse uuritava aine lõpliku biodegradatsiooni hindamiseks lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsiooni määramist. LOS-määramine pärast hapestamist ja puhastamist on eelistatum meetod kui lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioonide erinevuse ($C_{üld}$–$C_{anorgaaniline}$) arvutamine.

Samaaegne spetsiifilise analüüsimeetodi kasutamine võib anda võimaluse aine esmase degradatsiooni hindamiseks (lähteühendi keemilise struktuuri kadumine).

Meetod on kasutatav ainult nende uuritavate orgaaniliste ainete puhul, mis testis kasutatud kontsentratsiooni juures:

— on veeslahustuvad (vähemalt 20 mg lahustunud orgaanilist süsinikku/l),

— omavad tühist küllastatud aururõhu väärtust,

— ei ole bakterite suhtes pärssiva toimega,

— ei adsorbeeru oluliselt testisüsteemi,

— ei kao katselahusest vahu tekke tulemusena.

Määrata tuleb orgaanilise süsiniku sisaldus uuritavas materjalis.

Uuringutulemuste interpreteerimisel on kasulik teada uuritava materjali põhikomponentide kohta käivat informatsiooni. Seda eelkõige juhtudel, kui tulemused on väga väikesed või alammääralised.

Informatsioon aine toksilisuse kohta mikroorganismidesse võib olla kasulik väikeste tulemuste interpreteerimisel ja katseks sobiva kontsentratsiooni valimisel.

1.2. Definitsioonid ja ühikud

C_T = uuritava ühendi kontsentratsioon orgaanilise süsiniku juuresolekul või setitatud reoveele lisamisel aeratsiooniperioodi alguses (mg/l),

C_t = lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioon, mis on sedastatud uuringu supernatantvedelikus aeratsiooniperioodi lõpus (mg/l),

C_c = lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioon, mis on sedastatud kontrolli supernatantvedelikus aeratsiooniperioodi lõpus (mg/l).

Selle meetodi puhul defineeritakse biodegradatsiooni orgaanilise süsiniku kadumisena. Biodegradatsiooni saab väljendada järgmiselt:

1. Iga päev lisatud ainekogusest eemaldatud D_{da} protsent:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \quad [1]$$

kus D_{da} = degradatsioon/päevas lisamine.

2. Iga päeva alguses olemasolevast ainekogusest eemaldatud D_{ssd} protsent:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t\,(i+1)} + 3C_{c\,(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \quad [2(a)]$$

$$= \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \quad [2(b)]$$

kus D_{ssd} = degradatsioon/aine päeva alguses;

indeksid i ja (i+1) viitavad mõõtmispäevale.

Valem 2(a) on soovitatav, kui väljavoolu LOS erineb päevast päeva, mille juures aga valemit 2(b) võib kasutada, kui väljavoolu LOS püsib päevast päeva suhteliselt konstantsena.

1.3. **Võrdlusained**

Osadel juhtudel võib uue aine uurimisel olla kasu võrdlusainete kasutamisest. Siinjuures ei tooda aga ära spetsiifilisi võrdlusaineid.

Andmed ringtestides hinnatud ühendite kohta on äratoodud (vt liide 1) peamiselt nii, et meetodi kalibreerimist võib läbi viia pidevalt ja teistsuguse meetodi kasutamisel on võimalik tulemusi omavahel võrrelda.

1.4. **Uuringumeetodi põhimõte**

Reoveepuhastist pärit aktiivmuda asetatakse (SCAS) seadmeosasse. Lisatakse uuritav ühend ja setitatud olmereovesi ning segu aereeritakse 23 tundi. Seejärel aereerimine peatatakse, lastakse mudal settida ja vedelik valatakse ära.

Aeratsioonikambrisse jäänud muda segatakse järgmise uuritava ühendi alikvoodi ja reoveega ning tsüklit korratakse.

Biodegradatsioon tehakse kindlaks lahustunud orgaanilise süsiniku sisalduse põhjal supernatantvedelikus. Saadud tulemust võrreldakse näitajaga, mis on saadud ainult setitatud reoveest võetud kontrollist.

Kui kasutatakse spetsiifilist analüüsimeetodit, saab mõõta biodegradatsioonist tingitud eellasmolekuli kontsentratsiooni muutusi (primaarne biodegradatsioon).

1.5. **Kvaliteedikriteeriumid**

Selle lahustunud orgaanilise süsiniku eemaldamisel põhineva meetodi korduvteostatavust ei ole veel kinnitatud. (Kui kaalutakse primaarset biodegradatsiooni, saadakse väga täpsed andmed materjalide kohta, mida ulatuslikult degradeeritakse.)

Käesoleva meetodi tundlikkuse määrab suures osas põhilahuse varieeruvus ning vähesemal määral lahustunud orgaanilise süsiniku määramise täpsus ja uuritava ühendi sisaldus vedelikus iga tsükli alguses.

1.6. **Uuringuprotseduuri kirjeldus**

1.6.1. *Ettevalmistused*

Iga uuritava aine ja kontrolli jaoks ühendatakse piisav arv puhtaid aeratsiooniseadmeid (alternatiivina võib kasutada originaalset 1,5 l SCAS testi seadmeosa) ja õhu sisselaske torusid (joonis 1). Katseseadmetesse suunatud suruõhk (puhastatud läbi puuvillase filtri) ei tohiks sisaldada orgaanilist süsinikku ja peaks olema eelnevalt küllastatud veega, et vähendada kadusid aurumise tõttu.

Vedelikusegu proov, mis sisaldab 1–4 g suspendeeritud tahkeid osakesi/l saadakse peamiselt olmereovee puhastist pärit aktiivmudast. Iga aeratsiooniseadme kohta vajatakse ligikaudu 150 ml vedelikusegu.

Uuritava aine põhilahused valmistatakse destilleeritud vees; tavalisel juhul vajalik kontsentratsioon on 400 mg/l, kuna iga aeratsioonitsükli alguses annab orgaaniline süsinik uuritava ühendi kontsentratsiooniks 20 mg/l süsinikku, kui biodegradatsiooni ei teki.

Suuremad kontsentratsioonid on lubatud, kui toksilisus mikroorganismidele seda võimaldab.

Määratakse põhilahuste orgaanilise süsiniku sisaldus.

1.6.2. *Katsetingimused*

Katse tuleks läbi viia temperatuuril 20–25 °C.

Kasutatakse suuri aeroobsete mikroorganismide kontsentratsioone (1–4 g/l suspendeeritud kuivainet) ja efektiivne viibeaja periood on 36 tundi. Süsinikku sisaldavat materjali reovee söötmes oksüdeeritakse ulatuslikult, tavalisel juhul kaheksa tundi alates iga aeratsioonitsükli algusest. Seejärel muda respireerib endogeenselt ülejäänud aeratsiooniperioodi, mille käigus ainuke olemasolev substraat on uuritav ühend, kui see ei ole juba täielikult metaboliseeritud. Need omadused kombineerituna igapäevase testi reinokuleerimisega (kui keskkonnana kasutatakse olmereovett), tagavad äärmiselt soodsad tingimused nii aklimatsiooniks kui ka ulatuslikuks biodegradatsiooniks.

1.6.3. *Katse läbiviimine*

Peamiselt olmereoveest pärit aktiivmudaga puhastist või laboriseadmest võetakse vedelikusegu proov ja seda hoitakse aeroobsetes tingimustes kuni laboris kasutamiseni. Iga aeratsiooniseade ja samuti kontrollseade täidetakse 150 ml vedelikuseguga (kui kasutatakse SCAS originaaltesti ühikut, tuleb kogus kümnekordistada) ja alustatakse aereerimist. Pärast 23 tunni möödumist aeratsioon peatatakse ja mudal lastakse settida 45 minutit. Järjekorras avatakse kõik torude kraanid ja 100 ml-sed supernatantvedeliku osad eemaldatakse. Setitatud olmereovee proov võetakse vahetult enne kasutamist ja 100 ml lisatakse igasse aeratsiooniühikusse jäänud muda kogusele. Alustatakse uuesti aereerimist. Selles staadiumis enam uuritavat materjali juurde ei lisata ja seadmeosadesse lisatakse toitelahusena üks kord päevas olemreovett kuni saadakse seismisel läbipaistev supernatandi vedelik. Tavaliselt läheb kuni kaks nädalat, et lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldus supernatantvedelikus läheneks iga aeratsioonitsükli lõpus püsiväärtusele.

Selle perioodi lõpuks üksikud setitatud mudakogused segatakse kokku ja igasse seadmeossa lisatakse 50 ml saadud mudasegu.

Kontrollanumatesse lisatakse 95 ml setitatud reovett ja 5 ml vett ning katseanumatesse lisatakse 95 ml setitatud reovett koos 5 ml sobivat uuritavat ühendit sisaldava põhilahusega (400 mg/l). Aeratsiooni alustatakse uuesti ja jätkatakse 23 tundi. Mudal lastakse seejärel settida 45 minutit, vedelik valatakse pealt ära ja analüüsitakse sellest lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldust.

Eespool kirjeldatud "täida-eemalda" protseduuri korratakse iga päev kogu katse vältel.

Enne sadestamist võib olla vajalik anumate seinte puhastamine, et hoida ära tahkete osakeste kuhjumist üle vedeliku nivoo. Ristkontaminatsiooni vältimiseks kasutatakse iga seadme jaoks eraldi kaabitsat või harja.

Ideaalsel juhul tuleks lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldust supernatantvedelikus määrata iga päev, kuigi lubatud on ka harvemad analüüsid. Enne analüüsimist filtreeritakse vedelikud läbi pestud 0,45 µn membraanfiltrite või tsentrifuugitakse. Membraanifiltrid on sobivad, kui on tagatud, et nad ei lase läbi süsinikku ega absorbeeri ainet filtratsiooni etapis. Tsentrifuugis asuva proovi temperatuur ei tohi ületada 40 °C.

Vähese või mittemääratava biodegradatsiooniga ühenditega läbiviidava katse pikkus on kindlaks määramata, kuid kogemuse põhjal peaks see üldiselt olema vähemalt 12 nädalat, kuid mitte kauem kui 26 nädalat.

2. ANDMED JA HINDAMINE

Lahustunud orgaanilise süsiniku väärtused katse- ja kontrollanumate supernatantvedelikus kujutatakse graafikul võrdluses ajaga.

Biodegradatsiooni saavutamisel läheneb uuritava aine osas sedastatud tase kontrolli puhul kindlaks tehtud näitajale. Kui kahe taseme vahel leitud erinevus püsib kolme järjestikuse mõõtmise puhul, tehakse veel selline arv edasisi mõõtmisi, et võimaldada andmete statistilist töötlust, ja arvutatakse uuritava ühendi protsentuaalne biodegradatsioon (D_{da} või D_{ssd}, vt 1.2).

3. **ARUANNE**

3.1. **Uuringu raport**

Uuringu raport peaks võimaluse korral sisaldama järgnevat:

— kogu informatsioon, mis puudutab kasutatud reovett, seadmetüüpi, uuritava ainega seotud katsetulemusi, võrdlusainet, kui kasutati, ja põhilahust,

— temperatuur,

— eemaldamiskõver koos kirjeldusega, arvutamisviis (vt 1.2),

— kuupäev ja koht, kust võeti aktiivmuda ja reovee proovid, adaptatsiooni seisund, kontsentratsioon jne,

— kõikide uuringuprotseduuride muutuste teaduslik põhjendus,

— allkiri ja kuupäev.

3.2. **Tulemuste interpretatsioon**

Kuna sellisel meetodil uuritud aine ei ole täielikult biolagundatav, eemaldub LOS ainult biodegradatsiooni tõttu normaalsel juhul järk-järgult päevi ja nädalaid, v.a juhtudel, kui aklimatsioon on toimunud äkki (näidatud äkki kadumisena mõne nädala möödumisel).

Mõnikord võib olulist rolli mängida füüsikalis-keemiline adsorptsioon. See on näidatud juhul, kui esineb täielik või osaline lisatud LOS-eemaldamine alguses. Edasine käik sõltub faktoritest nagu adsorptsiooni ulatus ja suspendeeritud kuivaine sisaldus väljavoolu vees. Tavaliselt suureneb erinevus LOS-kontsentratsioonide vahel kontrollis ja proovi supernatantvedelikus järk-järgult algselt madalalt tasemelt ja see erinevus jääb seejärel uuele tasemele ülejäänud eksperimendiks, v.a aklimatisatsiooni korral.

Kui biodegradatsiooni (või osalise biodegradatsiooni) ja adsorptsiooni tuleb eristada, on vajalikud täiendavad testid. Seda saab teha mitmel erineval viisil, kuid kõige usaldusväärsem on supernatantvedeliku või muda kasutamine inokulaadina baasuuringu raames (eelistatult respiromeetriline uuring).

Selles uuringus tuleks kõrgeid, adsorptsiooni teel mitte-eemaldatavad LOS-tulemusi pidada potentsiaalselt biolagundatavateks. Osaline adsorptsiooni teel mitte-eemaldamine viitab sellele, et kemikaal allub vähemalt osalisele biodegradatsioonile.

LOS-eemaldamise madalate või null-näitajate põhjuseks võib olla mikroorganismide pärssimine uuritava aine poolt ja selle võib vallandada ka muda lõhustamine või kadu, mis tekitab häguse supernatandi. Testi tuleks korrata, kasutades uuritava aine madalamaid kontsentratsioone.

Spetsiifilise analüütilise meetodi või ^{14}C-märgistatud uuritava aine kasutamine võib anda suurema tundlikkuse. ^{14}C testi ühendi kasutamisel $^{14}CO_2$ sedastamine kinnitab biodegradatsiooni teket.

Kui tulemusi antakse ka primaarse biodegradatsiooni kohta, tuleks võimaluse korral anda selgitus keemilise struktuuri muutustele, mis viib uuritava eellasühendi vastusreaktsiooni kadumisele.

Analüütilise meetodi kinnitus tuleb edastada koos vastusega, mis saadi puhta katsekeskkonna kohta.

4. **VIITED**

1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 302 A*, Decision of the Council C(81) 30 final.

Liide 1

SCAS test: tulemuste näidised

Aine	C_T (mg/l)	C_t–C_c (mg/l)	Protsentuaalne biodegradatsioon, D_{da}	Katse kestus (päevades)
4-atsetüülaminobenseensulfonaat	17,2	2,0	85	40
Tetrapropüleenbenseensulfonaat	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenool	16,9	0,8	95,3	40
Dietüleenglükool	16,5	0,2	98,8	40
Aniliin	16,9	1,7	95,9	40
Tsüklopentaantetrakarboksülaat	17,9	3,2	81,1	120

Liide 2

Uuringuaparaadi näidis

Joonis 1

