31988L0302

1988.5.30. *AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK HIVATALOS LAPJA* L 133/1

A BIZOTTSÁG IRÁNYELVE

(1987. november 18.)

a veszélyes anyagok osztályozására, csomagolására és címkézésére vonatkozó törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezések közelítéséről szóló 67/548/EGK tanácsi irányelvnek a műszaki fejlődéshez történő kilencedik hozzáigazításáról

(88/302/EGK)

AZ EURÓPAI KÖZÖSSÉGEK BIZOTTSÁGA,

tekintettel az Európai Gazdasági Közösséget létrehozó szerződésre,

tekintettel a legutóbb a 79/831/EGK irányelvvel [1] a hatodik alkalommal módosított, a veszélyes anyagok osztályozására, csomagolására és címkézésére vonatkozó törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezések közelítéséről szóló, 1967. június 27-i 67/548/EGK tanácsi irányelvre [2] és különösen annak 19. cikkére,

mivel a 67/548/EGK irányelv 3. cikkének (1) bekezdése előírja az anyagok és készítmények fizikai és kémiai tulajdonságainak, toxicitásának, valamint ökotoxicitásának az V. mellékletben ismertetett módszerekkel történő meghatározását;

mivel a 67/548/EGK irányelv 3. cikkének (2) bekezdése előírja, hogy valamely anyag vagy készítmény környezetre gyakorolt tényleges, illetve esetleges veszélyeit a VII. és VIII. mellékletben foglalt rendelkezések alapján kell felmérni;

mivel a 84/449/EGK bizottsági irányelv [3] által bevezetett változat V. melléklete jelenleg csak a VII. mellékletben felsorolt jellemzők vizsgálati módszereit tartalmazza, ezért szükség van olyan vizsgálati módszerek rendelkezésre bocsátására is, amelyek viszont a VIII. mellékletben felsorolt jellemzőkre vonatkoznak;

mivel ezen irányelv rendelkezései összhangban vannak a veszélyes anyagok és készítmények kereskedelme technikai akadályainak felszámolásáról szóló irányelveknek a műszaki fejlődéshez történő hozzáigazításával foglalkozó bizottság véleményével,

ELFOGADTA EZT AZ IRÁNYELVET:

1. cikk

A 67/548/EGK irányelv V. melléklete ezen irányelv mellékletének a szövegével egészül ki.

2. cikk

A tagállamok legkésőbb 1988. december 31-ig elfogadják és kihirdetik azokat az intézkedéseket, amelyek szükségesek ahhoz, hogy ennek az irányelvnek megfeleljenek, és erről haladéktalanul tájékoztatják a Bizottságot. Az intézkedéseket legkésőbb 1989. június 30-tól alkalmazzák.

3. cikk

Ennek az irányelvnek a tagállamok a címzettjei.

Kelt Brüsszelben, 1987. november 18-án.

a Bizottság részéről

Stanley CLINTON DAVIS

a Bizottság tagja

[1] HL L 259., 1979.10.15., 10. o.
[2] HL 196., 1967.8.16., 1/67. o.
[3] HL L 251., 1984.9.19., 1. o.

MELLÉKLET

Az e mellékletben ismertetett vizsgálati módszerek a 79/831/EGK irányelv VIII. mellékletében felsorolt egyes toxikológiai és ökotoxikológiai tulajdonságok meghatározására szolgálnak. A VIII. melléklet 1., illetve 2. szakaszának megfelelő vizsgálati módszerek e jogszabályban ismertetésre kerülnek, de az egyes vizsgálatok a különböző szinteken betöltött szerepük szerint nincsenek osztályozva.

TARTALOM

B. RÉSZ: a toxicitás meghatározására szolgáló módszerek 93

Általános bevezetés: B. rész 93

Szubkrónikus orális toxicitásvizsgálat: 90 napos, ismételt orális adagolású vizsgálat rágcsáló fajokon 97

Szubkrónikus orális toxicitásvizsgálat: 90 napos, ismételt orális adagolású vizsgálat nem rágcsáló fajokon 101

Szubkrónikus dermális toxicitásvizsgálat: 90 napos, ismételt dermális adagolású vizsgálat rágcsáló fajokon 105

Szubkrónikus inhalációs toxicitásvizsgálat: 90 napos, ismételt inhalációs adagolású vizsgálat rágcsáló fajokon 109

Teratogenitási vizsgálat rágcsáló és nem rágcsáló fajokon 113

Krónikus toxicitásvizsgálat 116

A rákkeltő hatás vizsgálata 121

A krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás együttes vizsgálata 126

Egygenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat 132

Kétgenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat 136

Toxikokinetikai vizsgálat 140

Mutagenitásvizsgálat és a rákkeltő hatás szűrése: 144

– Génmutáció vizsgálata *Sacharomyces cerevisiae*-ben 144

– Mitotikus rekombináció-vizsgálat *Sacharomyces cerevisiae*-ben 147

– *In vitro* emlőssejtgénmutáció-vizsgálat 150

– DNS-károsodás és -reparáció – nem tervezett DNS-szintézis (unscheduled DNA synthesis, UDS) – emlőssejtek *in vitro*..... 153

– *In vitro* emlőstestvérkromatidkicserélődés- (sister chromatid exchange, SCE) vizsgálat 157

– Nemhez kötött recesszív letális vizsgálat *Drosophila melanogaster*ben 160

– *In vitro* emlőssejt-transzformációs vizsgálatok 162

– Domináns letális vizsgálat rágcsálókon 165

– *In vivo* emlőscsírasejt-citogenetika 168

– Egérfolt- (spot) teszt 171

– Egéren végzett örökletes transzlokációs vizsgálat 174

C. RÉSZ: Az ökotoxicitás meghatározásának módszerei 177

Általános bevezetés: C. rész 177

Növekedésgátlási vizsgálat algákon 178

Toxicitás földigilisztákra: Mesterséges talajban végzett vizsgálat 184

Biológiai lebomlás: Zahn–Wellens vizsgálat 188

Biológiai lebomlás: Eleveniszap-szimulációs vizsgálat 195

Biológiai lebomlás: Eleveniszap-légzésgátlási vizsgálat 207

Biológiai lebomlás: Módosított SCAS-vizsgálat 212

B. RÉSZ: A TOXICITÁS MEGHATÁROZÁSÁRA SZOLGÁLÓ MÓDSZEREK

ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS: B. RÉSZ

HOSSZÚ TÁVÚ KÍSÉRLETEK

Szubkrónikus, krónikus toxicitás- és karcinogenitás-vizsgálat

A vizsgált anyag és a kezelésre használt keverék jellemzése

Bármely toxicitási vizsgálat megkezdése előtt ismerni kell a vizsgált anyag összetételét, beleértve a jelentősebb szennyeződéseket és a fontosabb fizikokémiai tulajdonságokat, többek között a stabilitást.

A vizsgált anyag fizikokémiai tulajdonságai fontos információkkal szolgálnak az adagolás módjára, a szubkrónikus, krónikus és karcinogenitás-vizsgálatok megtervezésére, valamint a vizsgált anyagok kezelésének és tárolásának módjára vonatkozóan.

A kémiai szerkezettel és a fizikokémiai tulajdonságokkal kapcsolatos információ arról is tájékoztatást adhat, hogy a szándékolt adagolási mód szerint milyenek az abszorpciós viszonyok és a metabolikus, illetve szöveti eloszlás lehetőségei. Korábbi toxicitási és toxikokinetikai vizsgálatokból a toxikokinetikai paraméterekre vonatkozóan is rendelkezésre állhatnak kiegészítő információk.

A vizsgálatot egy olyan analitikai módszer kifejlesztésének kell megelőznie, amellyel a vizsgált anyag (és ahol lehet, főbb szennyezői) mind mennyiségileg, mind pedig minőségileg meghatározható az adagolási közegben és a biológiai anyagban.

Kísérleti állatok: a faj és a törzs kiválasztása

Mivel az állatokat élettartamuk egy jelentős részében kezelni akarjuk, a vizsgálatokhoz általában könnyen tartható és viszonylag rövid életű kísérleti fajokat szoktak választani. Igen kívánatos, hogy a kísérleti törzsnél – hasonló körülmények között történő tartás esetén – a spontán megbetegedések és daganatok előfordulásának gyakorisága ismert legyen.

A felhasznált törzsek legyenek jól ismertek és veleszületett rendellenességektől mentesek. A beltenyésztett törzsek és az F1 jelzésű hibridek használata ebből a szempontból jár némi előnnyel, ám ha elegendő mennyiségű háttéradat áll rendelkezésre a nem beltenyésztett törzsekről, és ha az állatok egymással közeli kapcsolatban álló állományokból származnak, akkor ez utóbbiak is elfogadhatóak.

Az állatok tartása, étrendje és vízellátása

Az állatkísérleteket és vizsgálatokat a nemzeti jogszabályoknak megfelelően kell végezni, és figyelembe kell venni a humánus megfontolásokat, valamint az állatvédelem területén bekövetkezett nemzetközi fejlődést is.

A környezeti körülmények szigorú ellenőrzése és a helyes állatgondozási technika elengedhetetlen ahhoz, hogy értelmezhető eredmények szülessenek. Az ismételt adagolással végzett vizsgálatok eredményeit nagymértékben befolyásolhatják az olyan tényezők, mint a tartási körülmények, az inkurrens betegségek, a gyógyszeres kezelés, a levegő, a víz, a takarmány, illetve az alom szennyezettsége és az állattartó létesítmény általános körülményei. Általános szabály, hogy ismerni kell a kémiai sterilizálóknak a vizsgálatra gyakorolt hatását is.

Az állatok étrendjének meg kell felelnie a szóban forgó állatfaj táplálkozási követelményeinek, és az ételben nem lehet olyan szennyeződés, amely befolyásolhatja a vizsgálat végeredményét. A rágcsálókat ad libitum kell takarmányozni és itatni, az élelmet legalább hetente egyszer cserélve. Jelenleg háromféle takarmányozási módszer használatos: a hagyományos, a szintetikus és a különféle speciális összetételű étrendek.

Bármelyiket is választjuk, a beszállító köteles időről időre ellenőrizni az alaptakarmány tápértékét és a benne található szennyezettség szintjét, és minden adag leszállításakor ezen információt a laboratórium tudomására hozza. Az alkalmazott étrend hatásának az anyagcserére, a daganatképződésre, valamint az állatok élettartamára vonatkozóan ismertnek kell lennie.

Az alaptakarmányt a kísérleti laboratórium is megvizsgálhatja mind az összetételre, mind a véletlenszerű szennyeződésekre nézve, beleértve a rákkeltő anyagokat is. Ha ez megtörtént, az elemzések eredményét meg kell őrizni, és csatolni kell minden egyes vizsgált anyagról készült záró vizsgálati jelentéshez.

Azon szokásos étrendi elemek, amelyekről tudjuk, hogy befolyásolják a daganatok képződését (például antioxidánsok, telítetlen zsírsavak, szelén), nem lehetnek káros mértékű koncentrációban jelen. Számos, a táplálékban általánosan előforduló szennyező anyagra a rákkeltő képesség meghatározását esetleg befolyásoló hatása miatt kiemelt figyelmet kell fordítani; ilyenek a peszticid-szermaradványok, a szerves klórvegyületek, a policiklikus aromás szénhidrogének, az ösztrogének, a nehézfémek, a nitrózaminok, valamint a mykotoxinok.

Ha a vizsgált anyagot vízzel vagy a takarmánnyal adják be, a stabilitási vizsgálatok elvégzése elengedhetetlen. Megfelelően elvégzett stabilitási és homogenitási vizsgálatokra van szükség az ismételt adagolású vizsgálatok elvégzését megelőzően, hogy megállapítható legyen a takarmánykészítés és a szükséges ellenőrzés gyakorisága.

Ha a takarmányt sterilizálásnak vetik alá, ismerni kell az eljárás hatását a vizsgált anyagra, valamint a táp összetevőire. Ha észlelhető ilyen jellegű befolyás, akkor el kell végezni a megfelelő módosításokat.

A karcinogenitás (a rákkeltő hatást vizsgáló) vizsgálatok során a vizsgálatot végzőknek tudniuk kell az ivóvízben esetlegesen jelen lévő szennyező anyagokról. Az emberi fogyasztásra engedélyezett víz legtöbb esetben megfelel; az összetételére vonatkozó információnak rendelkezésre kell állnia.

Előfordulhat, hogy a vizsgált anyag koncentrációját a takarmányban az állatok növekedésének megfelelően esetleg változtatni kell, hogy a testsúlyukhoz képest viszonylag állandó adagot kapjanak belőle.

A kontroll és a vizsgálati anyagot tartalmazó étrend tápértéke minél közelebb kell, hogy legyen egymáshoz. Ezért figyelembe kell venni a takarmányhoz kevert vizsgált anyag tápértékét is. A tapasztalat azt mutatja, hogy az alacsony tápértékű vizsgált anyagok 5 %-os arányig nem zavarják meg jelentősen a takarmány tápértékét.

1. **Inhalációs vizsgálatok**

Nincs határérték-vizsgálat, mert nem lehetséges egységes inhalációs expozíciós határértéket meghatározni.

2. **Teratogenitási vizsgálat**

A vizsgálati módszer alapvetően a szájon át történő adagoláson alapul. Ettől eltérő utakat is igénybe lehet venni a bejuttatáshoz, a vizsgált anyag fizikokémiai jellemzőitől és az emberi expozíció valószínű módjától függően. Ilyen esetekben a vizsgálati módszert a 28 napos vizsgálati módszer megfelelő elemeinek figyelembevételével kell átalakítani.

3. **Toxikokinetikai vizsgálatok**

A toxikokinetikai vizsgálatok a toxicitási adatok értelmezését és értékelését segítik elő. E vizsgálatok a vizsgált vegyi anyag toxicitásának sajátos aspektusait hivatottak megvilágítani, és eredményeik elősegíthetik a későbbi toxicitási vizsgálatok megtervezését. Azt, hogy minden esetben valamennyi paramétert meg kell-e határozni, nem lehet előre látni. Csak ritka esetben szükséges valamennyi toxikokinetikai vizsgálat (felszívódás, kiürülés, eloszlás, metabolizmus) elvégzése. Egyes vegyületeknél ajánlatos a vizsgálatok sorrendjét megváltoztatni vagy csupán egyetlen dózissal végezni a meghatározást.

Fogalommeghatározások

Toxikokinetika:	a vizsgált anyagok felszívódásának, kiürülésének, eloszlásának és metabolizmusának vizsgálata;
Felszívódás:	az(ok) a folyamat(ok), amely(ek) révén a beadott anyag a szervezetbe kerül;
Kiürülés:	az(ok) a folyamat(ok), amely(ek) révén a beadott anyag és/vagy annak bomlástermékei a szervezetből eltávoznak;
Eloszlás:	az(ok) a folyamat(ok), amely(ek) révén a beadott anyag és/vagy annak bomlástermékei a szervezetben szétoszlanak;
Metabolizmus:	az(ok) a folyamat(ok), amely(ek) révén a beadott anyagok a szervezetben enzimatikus vagy nem enzimatikus reakciók következtében szerkezetileg átalakulnak.

4. **Akut és szubakut vizsgálatok egy második kísérleti állatfaj esetében**

Valamely második fajon végzett vizsgálat célja, hogy kiegészítse az első állatfajon végzett kísérlet eredményeiből levont következtetéseket.

A második fajon végzett vizsgálatok esetén a már ismertetett vizsgálati módszer alkalmazható vagy adaptálható kisebb számú állatra.

5. **Fertilitási vizsgálatok**

Ha háromgenerációs szaporodási vizsgálatra van szükség, a két nemzedékre vonatkozó szaporodási vizsgálatokkal kapcsolatosan leírt módszert ki lehet terjeszteni a harmadik nemzedékre is.

6. **Mutagenitásvizsgálatok**

Kiegészítő mutagenitási vizsgálatok a karcinogenitás szempontjából végzett szűrővizsgálatokat is beleértve

Az irányelv VIII. melléklete kiegészítő vizsgálatokat tartalmaz a mutagenitás további vizsgálatára, illetve a rákkeltő hatás előszűrésére. Az e szakaszban leírt módszerek általában mindkét szempont vizsgálatára alkalmasak.

Bevezetés

Valamely anyag mutagenitási vizsgálatának kiinduló mérése baktériumok génmutációit (pontmutáció) és emlőssejtek *in vitro* vagy *in vivo* citogenetikai károsodását kimutató próbákból áll; az ilyen alapvizsgálatokra alkalmas módszereket korábban már ismertettük. E szakasz olyan kiegészítő vizsgálatokat foglal magában, amelyek az alapvizsgálatok során kapott eredmények igazolására és/vagy kiterjesztésére alkalmasak, és amelyeket számos célból végezhetünk:

1. az alapvizsgálat eredményeinek megerősítése;

2. az alapvizsgálat során nem vizsgált végpontok kimutatása;

3. *in vivo* vizsgálatok kezdeményezése vagy kiterjesztése.

E célokból az ismertetett vizsgálatok mind *in vitro,* mind pedig *in vivo* eukarióta rendszereket, valamint biológiai végpontok egy szélesebb tartományát is tartalmazzák. A vizsgálatok információt nyújtanak az alapvizsgálatok során használt baktériumoknál összetettebb élő szervezetekben kialakuló pontmutációkról is, továbbá bővítik ismereteinket arról, hogy egy anyag milyen mértékben képes kromoszóma-rendellenességek kiváltására.

A pontmutáció és a kromoszómaaberráció mellett más, végpontok kimutatására alkalmas vizsgálatok is ismertetésre kerülnek. Ezek kiegészítő tájékoztatással szolgálnak, és szükség szerint felhasználhatók a vizsgálati programban.

Általános alapelv, hogy amennyiben további mutagenitási vizsgálatok programját mérlegeljük, azokat úgy kell megtervezni, hogy releváns kiegészítő információkat adjanak a vizsgált anyag esetleges mutagén és/vagy karcinogén hatásáról.

Az, hogy az adott körülmények között milyen vizsgálatok lehetnek ténylegesen megfelelőek, számos tényezőtől függ, beleértve az anyag fizikokémiai jellemzőit, az alap bakteriális és citogenetikai vizsgálatok eredményeit, az anyag metabolitikus jellemzőit, egyéb toxicitási vizsgálatok eredményeit és az anyag ismert felhasználási céljait. Nem helyes a vizsgálatok kiválasztási rendjét szigorúan előírni, tekintettel a figyelembe veendő tényezők sokféleségére. Ennek ellenére van néhány általános alapelv, amely útmutatásul szolgálhat. Ha valamely vizsgálat az alapvizsgálatoknál pozitív eredménnyel zárult, akkor a kiegészítő vizsgálatnak legalább egy olyan módszert magában kell foglalnia, amely ugyanazon genetikai végpont kimutatására képes. Ha az alapvizsgálat mindkét vizsgálata negatív volt, kiegészítésként szokásos esetben egy génmutációs és egy kromoszóma-rendellenesség kimutatására alkalmas vizsgálatot kell elvégezni. Helyénvaló lehet (az alábbiakban felsorolt) ún. indikátorvizsgálatokból további adatokat nyerni.

Az ilyen jellegű vizsgálati módszereket az alábbiakban fő genetikai végpontjuk alapján csoportosítottuk.

A gén- (pont) mutációk kimutatására alkalmas vizsgálatok

Annak további vizsgálatára, hogy egy adott anyag képes-e gén- (pont) mutációk kiváltására, az alábbi vizsgálatok valamelyike lehet alkalmas:

a) Eukarióta mikroorganizmusok *(Saccharomyces cerevisiae)* előre, illetve hátra haladó mutációs vizsgálata.

b) Előre/oda mutáció *in vitro* vizsgálata emlőssejtekben.

c) A *Drosophila melanogaster* nemhez kötött recesszív letális mutációjának kimutatási próbája.

d) *In vivo* testi sejt mutációvizsgálata: egérfolt- (spot) vizsgálat.

Kromoszóma-rendellenességek kimutatására irányuló vizsgálatok

Annak további vizsgálatára, hogy valamely anyag képes-e kromoszóma-rendellenességet kiváltani, az alábbi vizsgálatok valamelyike lehet alkalmas:

a) Emlősök *in vivo* citogenetikai vizsgálata

Csontvelősejtek *in vivo* metafáziselemzése jöhet szóba, ha azt a kezdeti vizsgálatok (alapvizsgálatok) részeként még nem végezték el. Ezenkívül az emlőscsírasejtek citogenetikai vizsgálata is elvégezhető;

b) *In vitro* citogenetikai vizsgálatok emlőssejtben, ha azokat a kezdeti vizsgálatok (alapvizsgálatok) részeként még nem végezték el;

c) Domináns letális mutációvizsgálatok rágcsálókon.

d) Örökölhető transzlokációs vizsgálat egéren.

A DNS-re gyakorolt hatás indikátoros vizsgálata

Rendelkezésünkre állnak olyan módszerek, amelyek a DNS-re gyakorolt hatásról adnak bizonyos információkat, de amelyek végpontja nem mutagén esemény. E vizsgálatok kiegészítésül szolgálhatnak a mutagenitási vizsgálatokkal kapott eredményekhez, és hasznosak lehetnek ezek értelmezésében. Ha az említett módszerekre van szükség, az alábbi módszerek valamelyike lehet megfelelő eukarióta mikroorganizmusok vagy emlőssejtek felhasználásával:

a) mitotikus rekombináció *Saccharomyces cerevisiae-n*;

b) DNS-károsodás és -reparáció – nem tervezett DNS-szintézis – emlőssejteken *(in vitro)*;

c) *In vitro* testvérkromatid-kicserélődés emlőssejteken.

A rákkeltő potenciál megítélésének egyéb indikátoros vizsgálatai

Emlőssejt-transzformációs próbák is léteznek, amelyek az anyagnak azt a képességét mérik, hogy sejtkultúrában milyen mértékben változtatja meg azokat a morfológiai és funkcionális jellemzőket, amelyek *in vivo* valószínűleg a malignus transzformációban játszanak szerepet. Különböző típusú sejteket és transzformációs kritériumokat is fel lehet használni.

Emlősökre gyakorolt örökölhető hatások kockázatértékelése

Vannak olyan módszerek, amelyek a gén- (pont) mutációk (az egérspecifikus lokuszvizsgálat ([1])), illetve kromoszóma-rendellenességek (az örökölhető transzlokációs vizsgálat egéren) következtében kialakuló örökölhető hatások vizsgálatára alkalmasak emlősállatokon. Ilyen módszereket akkor alkalmazhatunk, amikor meg akarjuk becsülni, mekkora esetleges genetikai veszélyt jelent valamely anyag az emberre. Az ilyen vizsgálatok meglehetős bonyolultsága és a szükséges állatlétszám nagysága miatt azonban – különösen a specifikus lokuszvizsgálat esetében – a vizsgálat elvégzése előtt annak szükségességét alaposan meg kell indokolni.

([1]) Az egéren végzett lokuszvizsgálat (mouse specific locus test), amelynek leírását e dokumentum nem tartalmazza, a mutagén károsító anyaggal történő expozíciót követő első nemzedékben méri a csírasejtek mutációját. E vizsgálat segítségével kimutathatóak és mennyiségileg meghatározhatók a géntermékek, amelyek fenotípusosan is látható elváltozásokhoz vezető genetikai eltérések.

SZUBKRÓNIKUS ORÁLIS TOXICITÁSVIZSGÁLAT

90 NAPOS, ISMÉTELT ORÁLIS ADAGOLÁSÚ VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓ FAJOKON

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. Referenciaanyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A vizsgált anyagot naponta orálisan (szájon át), lépcsőzetesen emelkedő adagokban adjuk be több kísérleti állatcsoportnak, 90 napon keresztül. A vizsgálati időszak alatt az állatokat naponta kell vizsgálni a toxikus tünetek észlelése érdekében. A vizsgálat ideje alatt elpusztult állatokat fel kell boncolni, a vizsgálat lezárásakor pedig a túlélő állatokat is el kell pusztítani, és fel kell boncolni.

1.5. Minőségi követelmények

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

Előkészületek

Az állatokat a vizsgálat előtt legalább öt napon keresztül a vizsgálat tartási és takarmányozási körülményei között kell tartani. Az egészséges fiatal állatokat a vizsgálat megkezdése előtt véletlenszerű kiválasztással kezelt és kontrollcsoportokba kell beosztani.

A vizsgált anyagokat a táplálékkal, gyomorszondán át, kapszulában vagy ivóvízben lehet beadni. A vizsgált anyagokat valamennyi állatnak azonos módszerrel kell adagolni a vizsgálat teljes időtartama alatt. Ha az adagolás megkönnyítésére vivőanyagot vagy más adalékanyagot használunk, meg kell bizonyosodni arról, hogy azok nem rendelkeznek toxikus hatással. Ehhez szükség szerint korábbi vizsgálatokból származó adatokat is fel lehet használni.

Vizsgálati körülmények

A kísérlethez felhasznált állatok

Ha nincs ellenjavallat, patkányt kell kísérleti állatnak használni. Fiatal, egészséges, ivarérett, kísérleti célokra tenyésztett laboratóriumi állattörzsekből származó állatokat kell alkalmazni, az adagolást pedig ideális esetben az állatok hathetes kora előtt kell megkezdeni, de nyolchetes koruknál semmiképpen sem később. A vizsgálat kezdetén az állatok súlya lehetőleg csak minimálisan térjen el egymástól, az átlagos értéktől maximum ± 20 %-kal különbözhet. Ha a szubkrónikus orális vizsgálatot valamely hosszan tartó vizsgálat előkísérleteként végezzük el, mindkét vizsgálathoz ugyanazon fajt, illetve kísérleti állattörzset kell felhasználni.

Az állatok száma és neme

Minden adagolási szinthez legalább 20 állatot (10 hímet és 10 nőstényt) kell felhasználni. A nőstényeknél követelmény, hogy nem lehetnek leellettek vagy vemhesek. Ha időközi elpusztítást terveznek, akkor a létszámot annyival kell megnövelni, ahány állatot a vizsgálat befejezése előtt el szándékoznak pusztítani. Ezenkívül még egy 20 fős (nemenként 10 állat) kísérő állatcsoportot is kezelhetünk a legnagyobb dózissal 90 napon át, amelynek állatain a kezelés után 28 nappal megfigyelhetjük a toxikus hatás visszafordíthatóságát, elhúzódó vagy késve fellépő voltát.

Dózisszintek

Legalább három dózisszintet és egy egyidejű kontrollt kell használni. A vizsgált anyaggal történő kezelést kivéve a kontrollcsoportban lévő állatokkal pontosan ugyanolyan módon kell bánni, mint a vizsgálati csoportok állataival. Olyan esetekben, amikor az adagolás megkönnyítésére vivőanyagot alkalmazunk, a kontrollcsoportot ugyanúgy kell a vivőanyaggal megetetni, mint a kezelt csoportokat, és ugyanannyi vivőanyagot kell kapniuk, mint a legnagyobb adaggal kezelt csoportnak. A legnagyobb adagot úgy kell kiválasztani, hogy annak hatására jelentkezzenek a toxicitás jelei, de elhullások lehetőleg ne, vagy csak minimális mértékben legyenek. A legkisebb adaggal kezelt csoportban nem lehetnek toxikus hatásra utaló jelek. Ha használható becslés áll rendelkezésre az emberi expozícióra vonatkozóan, a legkisebb adagnak ennél nagyobbnak kell lennie. Kedvező esetben a középső adaggal kezelt csoportnál minimális toxikus hatás észlelhető. Ha egynél több közbeeső dózist alkalmazunk, akkor azokat úgy kell kiválasztani, hogy fokozódó toxikus hatást váltsanak ki.

Az alacsony és közbeeső dózisú, illetve a kontrollcsoportban az elpusztult állatok száma minimális legyen, hogy az eredmények értelmezhető értékelése lehetséges legyen.

Ha a vizsgált anyagot a táplálékkal adják be, annak vagy állandó legyen a koncentrációja a tápban (ppm vagy mg/kg, a takarmányra számítva), vagy az állat testsúlyára számított állandó adagot kell használni; az e módszertől való eltérést meg kell indokolni. A gyomorszondán át beadott anyag napi adagját mindennap ugyanabban az időben kell beadni. Az adagokat rendszeres időközönként (hetente vagy kéthetente) ismételten be kell állítani, hogy az állatok testsúlyához viszonyított mennyiséget fenn lehessen tartani.

Határérték-vizsgálat

Ha a fentebb ismertetett módszer szerint elvégzett, 90 napos vizsgálat napi 1 000 mg/testsúlykilogramm vagy – ha a lehetséges emberi expozíció mértéke ismert – ennél magasabb dózisban semmilyen toxikus hatást nem vált ki, a további vizsgálatok szükségtelennek tekinthetők. Alacsony toxicitású anyagoknál fontos biztosítani, hogy – ha azokat a takarmánnyal adják be – sem a vizsgált anyag adagolt mennyisége, sem más tulajdonságai nem befolyásolják a rendes táplálkozási feltételeket.

Megfigyelési időszak

Az összes állatot naponta meg kell vizsgálni, és a toxikus hatások megjelenését, súlyosságát és időtartamát rögzíteni kell. Fel kell jegyezni az elpusztulás időpontját és azt az időpontot, amikor a toxikus hatások jelei mutatkozni kezdenek, illetve elmúlnak.

A kísérlet végrehajtása

Ideális esetben a vizsgált anyagot heti hét alkalommal kell az állatoknak beadni, 90 napon keresztül. A kísérő csoportokban a nyomon követő megfigyelésekre kiválasztott állatokat további 28 napig kell tartani kezelés nélkül, hogy a toxikus hatás visszafordíthatóságát, illetve elhúzódását ki lehessen mutatni.

A ketrecben tartott állatok megfigyelésekor a bőr- és szőrelváltozásokra, a szemek és a nyálkahártyák változásaira, a légzési, a keringési rendszerre, az autonóm és a központi idegrendszer működésére, a szomatomotoros tevékenységekre, valamint a viselkedési mintákra kell figyelemmel lenni. Hetente mérni kell a takarmányfogyasztást (és a vízfogyasztást is, ha a vizsgált anyagot az ivóvízzel adagoljuk), valamint az állatok súlyát.

Az állatok rendszeres megfigyelésére azért van szükség, hogy megelőzhető legyen a kísérleti állatok kannibalizmus, szöveti autolízis, illetve rossz elhelyezés következtében történő elhullása. A vizsgálati időszak végeztével a kísérő csoportban lévő állatok kivételével minden túlélő állatot fel kell boncolni. A haldokló állatokat eltávolításuk után el kell pusztítani, és fel kell boncolni.

Az alábbi vizsgálatokat rendszeresen el kell végezni az összes állaton, beleértve a kontrollcsoport egyedeit is:

a) Lehetőleg minden állatot, de legalább a legnagyobb adaggal kezelt és a kontrollcsoportban lévő állatokat szemvizsgálatnak kell alávetni szemtükör vagy ezzel egyenértékű, megfelelő készülék segítségével az expozíciót megelőzően és a vizsgálat végeztével. Ha a szemen elváltozás észlelhető, akkor minden állatot meg kell vizsgálni.

b) A vizsgálati időszak végén hematológiai vizsgálatokat kell végezni: a hematokrit értéket, a hemoglobinkoncentrációt, a vörösvértestszámot, teljes és a minőségi fehérvérsejtszámot, az alvadási képességet, beleértve az alvadási időt, a protrombin időt, a tromboplasztin időt, illetve a trombocitaszámot kell mérni.

c) A vizsgálati időszak végeztével a vérmintákat klinikai-kémiai vizsgálatoknak is alá kell vetni. Fontos megvizsgálni az elektrolit-egyensúlyt, a szénhidrát-anyagcserét, a máj-, illetve a vesefunkciót. Az egyes vizsgálatok kiválasztását a vizsgált anyag hatásmechanizmusával kapcsolatos megfigyelések befolyásolják.

Javasolt meghatározni: a kalcium, a foszfor, a klorid, a nátrium, a kálium szintjét, éhgyomorra kell mérni a glükózszintet (az adott fajra jellemző és megfelelő éheztetési idő után); a szérum glutaminsav szőlősav transzamináz (GPT) [1], a szérum glutaminsav oxálsav transzamináz (GOT) [2], az ornitin dekarboxiláz, a gamma glutamil-transzpeptidáz, a karbamid nitrogén, az albumin, a kreatinin, az összes bilirubin és az összes szérumfehérje szintjét szintén meg kell határozni. További meghatározások, amelyekre a pontos toxicitás értékeléséhez még szükség lehet: lipid-elemzés, hormonok, sav-bázis egyensúly, methemoglobin és a kolineszteráz-aktivitás mérése. Ahol a megfigyelt hatások vizsgálatának kiterjesztéséhez szükséges, további klinikai-kémiai vizsgálatokat is lehet végezni.

d) Vizeletelemzésre általában nincs szükség, csak akkor, ha a várt vagy megfigyelt toxicitás ezt indokolja.

Ha a korábbi kísérletekből származó adatok nem megfelelőek, mérlegelendő a hematológiai és klinikai-kémiai paraméterek meghatározása az adagolás megkezdése előtt.

Autopszia

Minden állaton teljes körű makroszkópos boncolást kell végezni, amely a test külső felületének, a testnyílásoknak, valamint a koponya-, mell- és hasüregnek, illetve a bennük található szerveknek a feltárásából és vizsgálatából áll. A májat, a veséket, a mellékveséket és a heréket a kimetszés után minél előbb még nedvesen le kell mérni, a kiszáradás elkerülése miatt.

Az alábbi szerveket kell megfelelő közegben tartósan tárolni egy esetleges későbbi kórszövettani vizsgálat céljaira: valamennyi olyan szerv, amelyen makroszkopikus elváltozás található, az agy – beleértve a nyúltagy, a híd, a kisagykéreg, a nagyagykéreg és az agyalapi mirigy metszeteit, a pajzsmirigy és a mellékpajzsmirigy, bármilyen jelenlevő csecsemőmirigy, a légcső és a tüdő, a szív, az aorta, (a nyálmirigyek), a máj, a lép, a vesék, a mellékvesék, a hasnyálmirigy, az ivarmirigyek, a méh, (a járulékos nemi szervek), (a bőr), a nyelőcső, a gyomor, a patkóbél, az éhbél, a csípőbél, a vakbél, a vastagbél, a végbél, a húgyhólyag, a reprezentatív nyirokcsomók, (a női emlőmirigy), (a combizomzat), a perifériás idegek, a szegycsont a csontvelővel, (a szemek), (a combcsont az ízületi felülettel együtt), (a gerincoszlop három szinten – nyaki, mellkasközéptáji és ágyéki csigolyáknál) és az extraordinális könnymirigy. A zárójelben említett szöveteket csak akkor kell megvizsgálni, ha célszervként szerepelnek, illetve ha a toxicitás tünetei ezt indokolják.

Kórszövettani vizsgálatok

a) Teljes körű kórszövettani vizsgálatot kell végezni a kontrollcsoport és a legnagyobb adaggal kezelt csoport állatainak szervein és szövetein.

b) Az összes olyan szervet, amelyen makroszkopikus elváltozás található, meg kell vizsgálni.

c) A többi dóziscsoport állatainak célszerveit is meg kell vizsgálni.

d) A legkisebb, illetve közepes dózissal kezelt csoportok állatainak tüdejét kórszövettani vizsgálatnak kell alávetni a fertőzés jeleit keresve, ez ugyanis az állat egészségi állapotának alkalmas értékelésére szolgál. E csoportoknál a máj és a vese kórszövettani vizsgálatát is meg kell fontolni. E csoportok állatainál további kórszövettani vizsgálatokra rutinszerűen nincs szükség, de minden esetben vizsgálatokat kell végezni az olyan szerveken, amelyek az elváltozás jeleit mutatták a legnagyobb dózissal kezelt csoportban.

e) Ha kísérő csoportot is használunk, azokon a szöveteken és szerveken, amelyek a kezelt csoportokban elváltozásokat mutattak, itt is el kell végezni a kórszövettani vizsgálatokat.

2. ADATOK

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, amely minden vizsgálati csoportban megadja az állatok számát a vizsgálat kezdetén, az elváltozásokat mutató állatok számát, valamint az elváltozások egyes típusait; illetve az elváltozást mutató állatok százalékos arányát. Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni. Bármely elfogadott statisztikai módszer használható.

3. ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– használt faj, törzs, az állatok származása, tartási körülmények, étrend,

– vizsgálati körülmények,

– adagolás (beleértve a vivőanyagot is, ha van) és koncentrációk,

– a toxikus reakciók nemenként és dózisonként,

[1] Ma szérum alanin aminotranszferáz néven ismert.
[2] Ma szérum aszparaginsav aminotranszferáz néven ismert.

– lehetőség szerint az a szint, amikor még nincs toxikus hatás,
– az elpusztulás ideje a vizsgálat során, illetve, hogy az állatok megélték-e a vizsgálat végét,
– a toxikus és más hatások leírása,
– az egyes mérgezési tünetek megfigyelésének időpontja és a megfigyelést követő változásuk,
– a takarmány fogyasztásával és a testsúly változásával kapcsolatos adatok,
– szemészeti leletek,
– az elvégzett hematológiai vizsgálatok és azok valamennyi eredménye,
– az elvégzett klinikai-kémiai vizsgálatok és azok valamennyi eredménye (beleértve az esetleges vizeletelemzés eredményeit is),
– boncolási leletek,
– a kórszövettani vizsgálatok eredményének részletes ismertetése,
– az eredmények statisztikai feldolgozása, ahol lehetséges,
– az eredmények megvitatása,
– az eredmények értelmezése.

3.2. **Értékelés és értelmezés**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

SZUBKRÓNIKUS ORÁLIS TOXICITÁSVIZSGÁLAT

90 NAPOS, ISMÉTELT ORÁLIS ADAGOLÁSÚ VIZSGÁLAT NEM RÁGCSÁLÓ FAJOKON

1. **MÓDSZER**

1.1. **Bevezetés**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2 **Fogalommeghatározások**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. **Referenciaanyagok**

Nincsenek.

1.4. **A vizsgálati módszer elve**

A vizsgált anyagot naponta orálisan (szájon át), fokozatos adagokban adjuk be több kísérleti állatcsoportnak (nem rágcsálóknak), 90 napon keresztül. A vizsgálati időszak alatt az állatokat naponta kell vizsgálni a mérgezés jeleinek észlelése érdekében. A vizsgálat ideje alatt elpusztult állatokat is el kell pusztítani, és fel kell boncolni, a vizsgálat lezárásakor pedig a túlélő állatokat is fel kell boncolni.

1.5. **Minőségi követelmények**

Nincsenek.

1.6. **A vizsgálati módszer leírása**

Előkészületek

Az állatokat a vizsgálat előtt legalább öt napon keresztül a vizsgálat tartási és takarmányozási körülményei között kell tartani. Az egészséges, fiatal állatokat a vizsgálat megkezdése előtt véletlenszerű kiválasztással kezelt és kontrollcsoportokba kell beosztani.

A vizsgált anyagokat a táplálékkal vagy kapszulában lehet beadni. Más adagolási módszerek is elfogadhatók. A vizsgált anyagokat valamennyi állatnak azonos módszerrel kell adagolni a vizsgálat teljes időtartama alatt. Ha az adagolás megkönnyítésére vivőanyagot vagy más adalékanyagot használunk, meg kell bizonyosodni arról, hogy azok nem rendelkeznek toxikus hatással. Ehhez szükség szerint korábbi vizsgálatokból származó adatokat is fel lehet használni.

Vizsgálati körülmények

A kísérlethez falhasznált állatok

A leggyakrabban használt nem rágcsáló kísérleti állatfaj a kutya, lehetőség szerint egy meghatározott fajta. Más nem rágcsáló faj is használható. Egészséges és fiatal állatokat kell használni – kutya esetében az életkor az adagolás megkezdésekor négy–hat hónap között legyen, de kilenc hónapnál semmiképpen sem lehetnek idősebbek. Ha a szubkrónikus orális vizsgálatot valamely hosszú távú vizsgálat előzményeként végezzük, mindkét vizsgálathoz ugyanazon fajt, illetve kísérleti állattörzset kell felhasználni.

Az állatok száma és neme

Minden adagolási szinthez legalább nyolc állatot (négy hímet és négy nőstényt) kell felhasználni. A vizsgálat végén megmaradó állatok számának elegendőnek kell lennie a toxikus hatások értelmezhető értékeléséhez.

Adagolási szintek (dózisok)

Legalább három adagolási szintet (dózist) és egy kontrollt kell használni. A vizsgált anyaggal történő kezelést kivéve a kontrollcsoportban lévő állatokkal pontosan ugyanolyan módon kell bánni, mint a vizsgálati csoportok állataival. A legnagyobb adagot úgy kell kiválasztani, hogy annak hatására jelentkezzenek a toxicitás jelei, de elhullások ne legyenek. A legkisebb adaggal kezelt csoportban nem lehetnek a toxicitásra utaló jelek. Ha használható becslés áll rendelkezésre az emberi expozícióra vonatkozóan, a legkisebb adagnak ennél nagyobbnak kell lennie. Kedvező esetben a középső adaggal kezelt csoportnál minimális toxikus hatás észlelhető. Ha egynél több közbeeső dózist alkalmazunk, akkor azokat úgy kell kiválasztani, hogy fokozódó toxikus hatást váltsanak ki.

A legalacsonyabb és a közepes adaggal kezelt csoportban, valamint a kontrollcsoportban lehetőleg ne pusztuljanak el az állatok.

Alacsony toxicitású anyagoknál fontos annak biztosítása, hogy ha azt a takarmánnyal adjuk be, a vizsgált anyag alkalmazott mennyisége ne zavarja meg a normális táplálkozást.

Ha a vizsgált anyagot a táplálékkal adjuk be, annak vagy állandó legyen a koncentrációja a tápban (ppm vagy mg/kg, a takarmányra számítva), vagy az állat testsúlyára számított állandó adagot használjunk; az e módszertől való eltérést meg kell indokolni.

Amennyiben az anyagot közvetlenül, pl. egy kapszulában adjuk be, akkor annak mindennap ugyanabban az időben kell megtörténnie. Az adagokat hetente ismételten be kell állítani, hogy az állatok testsúlyához viszonyított mennyiséget fenn lehessen tartani. Ha a szubkrónikus vizsgálatot valamely hosszú távú vizsgálat előzményeként végzik, akkor mindkét vizsgálathoz hasonló étrendet kell alkalmazni.

Határérték-vizsgálat

Ha a fentebb ismertetett módszer szerint elvégzett, 90 napos vizsgálat napi 1 000 mg/testsúlykilogramm vagy – ha a lehetséges emberi expozíció mértéke ismert – ennél magasabb dózisban semmilyen toxikus hatást nem vált ki, a további vizsgálatok szükségtelennek tekinthetők. Alacsony toxicitású anyagoknál fontos biztosítani, hogy – ha azokat a takarmánnyal adják be – se a vizsgált anyag adagolt mennyisége, se más tulajdonságai ne befolyásolják a rendes táplálkozási feltételeket.

Megfigyelési időszak

Az összes állatot naponta meg kell vizsgálni, és a toxikus hatások megjelenését, súlyosságát és időtartamát rögzíteni kell. Fel kell jegyezni az elpusztulás időpontját és azt az időpontot, amikor a toxikus hatások jelei mutatkozni kezdenek, illetve elmúlnak.

A kísérlet végrehajtása

Ideális esetben a vizsgált anyagot heti hét alkalommal kell az állatoknak beadni, 90 napon keresztül. Ha azonban az anyagot elsősorban gyakorlati megfontolások miatt nem a takarmánnyal adjuk be, a heti öt napon át tartó adagolás is elfogadhatónak tekinthető.

Az állatok megfigyelése kiterjed, de nem korlátozódik a bőr- és szőrelváltozásokra, a szemek és a nyálkahártyák változásaira, valamint a légzési, a keringési rendszerre, az autonóm és a központi idegrendszer működésére, a szomatomotoros tevékenységekre, valamint a viselkedési mintákra. Hetente mérni kell a takarmányfogyasztást (és a vízfogyasztást is, ha a vizsgált anyagot az ivóvízzel adagoljuk), valamint az állatok súlyát.

Alapos klinikai vizsgálatokat kell naponta az állatokon elvégezni, valamint meg kell tenni a megfelelő óvintézkedéseket azért, hogy a kísérleti állatok vizsgálat során történő elpusztulását a lehető legkisebbre csökkentsük. Az expozíciós időszak végeztével minden túlélő állatot fel kell boncolni. A haldokló állatokat eltávolításuk után el kell pusztítani, és fel kell boncolni.

Az alábbi vizsgálatokat rendszeresen el kell végezni az összes állaton, beleértve a kontrollcsoport egyedeit is:

a) Lehetőleg minden állatot, de legalább a legnagyobb adaggal kezelt és a kontrollcsoportban lévő állatokat szemvizsgálatnak kell alávetni szemtükör vagy ezzel egyenértékű, megfelelő készülék segítségével a vizsgált anyag beadása előtt és a vizsgálat végeztével. Ha a szemen elváltozás észlelhető, akkor minden állatot meg kell vizsgálni.

b) A hematológiai vizsgálat részeként a vizsgálati időszak kezdetén, azt követően vagy havi rendszerességgel, vagy a vizsgálati idő felének leteltét követően, majd a vizsgálat lezárásakor mérni kell a hematokrit-értéket, a hemoglobin-koncentrációt, a vörösvértestszámot, a minőségi- és a teljes fehérvérsejtszámot, az alvadási képességet, beleértve az alvadási időt, a protrombin időt, a tromboplasztin időt, illetve a trombocitaszámot.

c) A vizsgálati időszak kezdetén, azt követően vagy havi rendszerességgel, vagy a vizsgálati idő felének leteltét követően, majd a vizsgálat lezárásakor a vérmintákat klinikai kémiai vizsgálatoknak is alá kell vetni. A következő vizsgálatokat kell elvégezni: elektrolit-egyensúly, szénhidrát-anyagcsere, máj-, illetve vesefunkció vizsgálata. Az egyes vizsgálatok kiválasztását a vizsgált anyag hatásmechanizmusával kapcsolatos megfigyelések befolyásolják. Javasolt meghatározni: a kalcium, a foszfor, a klorid, a nátrium, a kálium szintjét, éhgyomorra kell mérni a glükóz szintjét (az adott fajra jellemző és megfelelő éheztetési idő után), a szérum glutaminsav szőlősav transzaminináz (GPT) [1], a aszérum glutaminsav oxálsav transzaminináz (GOT) [2], az ornitin dekarboxiláz, a gamma glutamil-transzpeptidáz, a karbamid nitrogén, az albumin, a kreatinin, az összes bilirubin és az összes szérumfehérje szintjét szintén meg kell határozni. További meghatározások,

[1] Ma szérum alanin aminotranszferáz néven ismert.
[2] Ma szérum aszparaginsav aminotranszferáz néven ismert.

amelyekre a pontos toxicitásértékeléshez még szükség lehet: lipidelemzés, hormonok, sav-bázis egyensúly, methemoglobin és kolineszteráz-aktivitás mérése. Ahol a megfigyelt hatások vizsgálatának kiterjesztéséhez szükséges, további klinikai-kémiai vizsgálatokat is lehet végezni. A nem rágcsáló fajokat a vérvétel előtt bizonyos ideig (24 óránál nem tovább) éheztetni kell.

d) Vizeletelemzésre általában nincs szükség, csak akkor, ha a várt vagy megfigyelt toxicitás ezt indokolja.

Autopszia

Minden állaton teljes körű makroszkópos boncolást kell végezni, amely a test külső felületének, a testnyílásoknak, valamint a koponya-, mell- és hasüregnek, illetve a bennük található szerveknek a feltárásából és vizsgálatából áll. A májat, a veséket, a mellékveséket és a heréket a kimetszés után minél előbb még nedvesen le kell mérni, a kiszáradás elkerülése miatt.

Az alábbi szerveket kell megfelelő közegben tartósan tárolni egy esetleges későbbi kórszövettani vizsgálat céljaira: valamennyi olyan szerv, amelyen makroszkópikus elváltozás található, az agy – beleértve a nyúltagy, a híd, a kisagykéreg, a nagyagykéreg és az agyalapi mirigy metszeteit, a pajzsmirigy és a mellékpajzsmirigy, bármilyen jelenlevő csecsemőmirigy, (légcső) és a tüdő, a szív, az aorta, a nyálmirigyek, a máj, a lép, a vesék, a mellékvesék, a hasnyálmirigy, az ivarmirigyek, a méh, (a járulékos nemi szervek), (a bőr), az epehólyag, a nyelőcső, a gyomor, a patkóbél, az éhbél, a csípőbél, a vakbél, a vastagbél, a végbél, a húgyhólyag, a reprezentatív nyirokcsomók, (a női emlőmirigy), (a combizomzat), a perifériás idegek, a szegycsont a csontvelővel, (a szemek), (a combcsont az ízületi felülettel együtt), (a gerincoszlop három szinten – nyaki, mellkasközéptáji és ágyéki csigolyáknál) és az extraordinális könnymirigy. A zárójelben említett szöveteket csak akkor kell megvizsgálni, ha célszervként szerepelnek, illetve ha a toxicitás tünetei ezt indokolják.

Kórszövettani vizsgálatok

Teljes körű kórszövettani vizsgálatot kell végezni a kontrollcsoport és a legnagyobb adaggal kezelt csoport állatainak szervein és szövetein. A többi csoportban további kórszövettani vizsgálat azokon a szerveken szükséges, amelyek a legnagyobb adaggal kezelt csoportokban elváltozásokat mutattak, illetve amelyek esetében a klinikai megfigyelések ennek szükségességét jelzik.

2. ADATOK

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, amely minden vizsgálati csoportban megadja az állatok számát a vizsgálat kezdetén, az elváltozásokat mutató állatok számát, valamint az elváltozások egyes típusait, illetve az elváltozást mutató állatok százalékos arányát. Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni. Bármely elfogadott statisztikai módszer használható.

3. ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– használt faj, törzs, az állatok származása, tartási körülmények, étrend,

– vizsgálati körülmények,

– adagolás (beleértve a vivőanyagot is, ha van) és koncentrációk,

– a toxikus reakciók nemenként és dózisonként,

– lehetőség szerint az a szint, amikor még nincs toxikus hatás,

– az elpusztulás ideje a vizsgálat során, illetve, hogy az állatok megélték-e a vizsgálat végét,

– a toxikus és más hatások leírása (különös tekintettel a klinikai leletekre),

– az egyes mérgezési tünetek megfigyelésének időpontja és a megfigyelést követő változásuk,

– a takarmány fogyasztásával és a testsúly változásával kapcsolatos adatok,

– szemészeti leletek,

– az elvégzett hematológiai vizsgálatok és azok valamennyi eredménye,
– az elvégzett klinikai-kémiai vizsgálatok és azok valamennyi eredménye (beleértve az esetleges vizeletelemzés eredményeit is),
– boncolási leletek,
– a kórszövettani vizsgálatok eredményének részletes ismertetése,
– az eredmények statisztikai feldolgozása, ahol lehetséges,
– az eredmények megvitatása,
– az eredmények értelmezése.

3.2. **Értékelés és értelmezés**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

SZUBKRÓNIKUS DERMÁLIS TOXICITÁSVIZSGÁLAT

90 NAPOS, ISMÉTELT DERMÁLIS ADAGOLÁSÚ VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓ FAJOKON

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. Referenciaanyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A vizsgált anyagot naponta a bőrre adagoljuk, fokozatosan növekvő dózisokban több kísérleti állatcsoportnak, 90 napon keresztül. A vizsgálati időszak alatt az állatokat naponta kell vizsgálni a mérgezés jeleinek észlelése érdekében. A vizsgálat ideje alatt elpusztult állatokat fel kell boncolni, a vizsgálat lezárásakor pedig a túlélő állatokat is el kell pusztítani, és fel kell boncolni.

1.5. Minőségi követelmények

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

Előkészületek

Az állatokat a vizsgálat előtt legalább öt napon keresztül a vizsgálat tartási és táplálási körülményei között kell tartani. Az egészséges, fiatal állatokat a vizsgálat megkezdése előtt véletlenszerű kiválasztással kezelt és kontrollcsoportokba kell beosztani. A vizsgálat megkezdése előtt nem sokkal a törzs háti felületén le kell nyírni az állatok szőrét. Borotválni is lehet, de azt a vizsgálat megkezdése előtt megközelítőleg 24 órával kell elvégezni. A vizsgálat során általában ismételt nyírás és borotválás szükséges, rendszerint heti időközönként. A nyírás vagy borotválás során gondosan ügyelni kell arra, hogy a bőrt ne sértsük meg. A testfelület legalább 10 %-át szabaddá kell tenni a vizsgált anyag alkalmazásához. Az állat testsúlyát is tekintetbe kell venni, amikor a megtisztítandó felületről, illetve a fedőkötés méretéről döntünk. Ha szilárd anyagot vizsgálunk, amelyet adott esetben porítani is lehet, az anyagot vízzel kellően át kell nedvesíteni, vagy szükség esetén vivőanyagot kell alkalmazni annak biztosítására, hogy a bőrrel megfelelő módon érintkezzen. A folyékony vizsgálati anyagokat rendszerint hígítás nélkül kell adagolni. Az adagolás heti öt-hét alkalommal történik.

Vizsgálati körülmények

A kísérlethez felhasznált állatok

Kifejlett patkány, nyúl vagy tengerimalac használható. Más faj is használható, de azok használatát meg kell indokolni. A vizsgálat kezdetén az állatok súlya lehetőleg csak minimálisan térjen el egymástól, az átlagos értéktől maximum ± 20 %-kal különbözhet. Ha a szubkrónikus dermális vizsgálatot valamely hosszú távú vizsgálat előzetes vizsgálataként végezzük, mindkét vizsgálathoz ugyanazon fajt, illetve kísérleti állattörzset kell felhasználni.

Az állatok száma és neme

Minden adagolási szinthez legalább 20 egészséges bőrű állatot (10 hímet és 10 nőstényt) kell felhasználni. A nőstényeknél követelmény, hogy nem lehetnek leellettek vagy vemhesek. Ha időközi elpusztítást tervezünk, akkor a létszámot annyival kell megnövelni, ahány állatot a vizsgálat befejezése előtt el akarunk pusztítani. Ezenkívül még egy 20 fős (nemenként 10 állat) kísérő állatcsoportot is kezelhetünk a legnagyobb adaggal 90 napon át, amelyeknek állatain a kezelés után 28 nappal megfigyelhetjük a toxikus hatás visszafordíthatóságát, elhúzódó vagy késve fellépő voltát.

Adagolási szintek (dózisok)

Legalább három adagolási szintet (dózist) és egy kontrollt kell használni, illetve egy vivőanyagkontrollt, ha van vivőanyag. Az expozíciós idő legalább napi hat óra legyen. A vizsgált anyagot mindennap hasonló időpontban kell alkalmazni, az alkalmazott mennyiséget pedig meghatározott időközönként (hetente vagy kéthetente) hozzá kell igazítani az állatok növekedéséhez, hogy az állatok testsúlyához viszonyított mennyiséget fenn lehessen tartani. A vizsgált anyaggal történő kezelést kivéve a kontrollcsoportban lévő állatokkal pontosan ugyanolyan módon kell bánni, mint a vizsgálati csoportok állataival. Olyan esetekben, amikor az adagolás megkönnyítésére vivőanyagot alkalmazunk, a kontrollcsoportot ugyanúgy kell a vivőanyaggal kezelni, mint a kezelt csoportokat, és ugyanannyi vivőanyagot kell kapniuk, mint a legnagyobb adaggal kezelt csoportnak. A legnagyobb adagot úgy kell kiválasztani, hogy abban jelentkeznie kell a toxikus hatásnak, de elhullások lehetőleg ne, vagy csak minimális mértékben legyenek. A legkisebb adaggal kezelt csoportban nem lehetnek a toxicitásra utaló jelek. Ha használható becslés áll rendelkezésre az emberi expozícióra vonatkozóan, a legkisebb adagnak ennél nagyobbnak kell lennie. Kedvező esetben a középső adaggal kezelt csoportnál minimális toxikus hatás észlelhető. Ha egynél több közbeeső dózist alkalmazunk, akkor azokat úgy kell kiválasztani, hogy fokozódó toxikus hatást váltsanak ki. Az alacsony és közbeeső dózisú, illetve a kontrollcsoportban az elpusztult állatok száma minimális legyen, hogy az eredmények értelmezhető értékelése lehetséges legyen.

Ha a vizsgált anyag alkalmazása súlyos bőrirritációt okoz, a koncentrációt csökkenteni kell, ami az egyéb toxikus hatások mértékének csökkenésével vagy eltűnésével járhat a legnagyobb adaggal kezelt csoportban. Ha a bőr súlyosan károsodott, szükségessé válhat a vizsgálat leállítása és egy új vizsgálat megkezdése kisebb koncentrációk mellett.

Határérték-vizsgálat

Ha az előzetes vizsgálat során napi 1 000 mg/testsúlykilogrammal adagolt vizsgált anyag vagy – ha a lehetséges emberi expozíció mértéke ismert – ennél magasabb dózis semmilyen toxikus hatást nem vált ki, a további vizsgálatok szükségtelennek tekinthetők.

Megfigyelési időszak

Az összes állatot naponta meg kell vizsgálni a toxikus hatások megjelenésének észlelése érdekében. Fel kell jegyezni az elpusztulás időpontját, valamint azt az időpontot, amikor a toxikus hatás jelei mutatkozni kezdenek, illetve elmúlnak.

A kísérlet végrehajtása

Az állatokat egyesével kell a ketrecekben elhelyezni. Ideális esetben a vizsgált anyagot heti hét alkalommal kell az állatoknak beadni, 90 napon keresztül.

A kísérő csoportokban a nyomon követő megfigyelésekre kiválasztott állatokat további 28 napig kell tartani kezelés nélkül, hogy a toxikus hatás visszafordíthatóságát, illetve elhúzódását ki lehessen mutatni. Az anyaggal való érintkezés ideje napi hat óra.

A vizsgált anyagot a testfelület megközelítőleg 10 %-át kitevő felületen egyenletesen elosztva kell felvinni az állat bőrére. Erősen mérgező anyagoknál a felület lehet ennél kisebb, de a felület lehető legnagyobb részét a lehető legvékonyabb és legegyenletesebb bevonattal kell ellátni.

Az expozíció ideje alatt a vizsgált anyagot a bőrrel egy lyukacsos gézlap segítségével és nem irritáló ragasztószalaggal kell érintkezésben tartani. A vizsgált területet megfelelő módon be kell fedni azért, hogy megmaradjon rajta a vizsgált anyag és a gézkötés, és az állatok ne nyalhassák le a vizsgált anyagot. Mozgásgátló szerkezeteket lehet használni annak megakadályozására, hogy az állat a vizsgált anyagot lenyelje, de a teljes immobilizáció mint módszer nem javasolt.

Az expozíciós idő leteltével a maradék vizsgált anyagot lehetőség szerint el kell távolítani a bőr felületének vízzel vagy más megfelelő módon történő megtisztítása útján.

Az összes állatot naponta meg kell vizsgálni, és a toxikus hatások megjelenését, súlyosságát és időtartamát rögzíteni kell. A ketrecben tartott állatok megfigyelésekor a bőr- és szőrelváltozásokra, a szemek és a nyálkahártyák változásaira, valamint a légzési, a keringési rendszerre, az autonóm és a központi idegrendszer működésére, a szomatomotoros tevékenységekre, valamint a viselkedési mintákra kell figyelemmel lenni. Hetente mérni kell a takarmányfogyasztást, valamint az állatok súlyát. Az állatok rendszeres megfigyelésére azért van szükség, hogy megelőzzük a kísérleti állatok kannibalizmus, szöveti autolízis, illetve rossz elhelyezés következtében történő elhullását. A vizsgálati időszak végeztével a kísérő csoportban lévő állatok kivételével minden túlélő állatot fel kell boncolni. A haldokló állatokat eltávolításuk után el kell pusztítani, és fel kell boncolni.

Az alábbi vizsgálatokat rendszeresen el kell végezni az összes állaton, beleértve a kontrollcsoport egyedeit is:

a) Lehetőleg minden állatot, de legalább a legnagyobb adaggal kezelt és a kontrollcsoportban lévő állatokat szemvizsgálatnak kell alávetni szemtükör vagy ezzel egyenértékű, megfelelő készülék segítségével az expozíciót megelőzően és a vizsgálat végeztével. Ha a szemen elváltozás észlelhető, akkor minden állatot meg kell vizsgálni.

b) A hematológiai vizsgálat részeként a vizsgálati időszak végeztével mérni kell a hematokrit-értéket, a hemoglobin-koncentrációt, a vörösvértestszámot, a minőségi- és a teljes fehérvérsejtszámot, az alvadási képességet, beleértve az alvadási időt, a protrombin időt, a tromboplasztin időt, illetve a trombocitaszámot.

c) A vizsgálati időszak végeztével a vérmintákat klinikai-kémiai vizsgálatoknak is alá kell vetni. Fontos megvizsgálni az elektrolit-egyensúlyt, a szénhidrát-anyagcserét, a máj-, illetve a vesefunkciót. Az egyes vizsgálatok kiválasztását a vizsgált anyag hatásmechanizmusával kapcsolatos megfigyelések befolyásolják. Javasolt meghatározni: a kalcium, a foszfor, a klorid, a nátrium, a kálium szintjét, éhgyomorra kell mérni a glükózszintet (az adott fajra jellemző és megfelelő éheztetési idő után), a szérum glutaminsav szőlősav transzamináz (GPT) ([1]), a szérum glutaminsav oxálsav transzamináz (GOT) ([2]), az ornitin dekarboxiláz, a gamma glutamil-transzpeptidáz, a karbamid nitrogén, az albumin, a kreatinin, az összes bilirubin és az összes szérumfehérje szintjét szintén meg kell határozni. További meghatározások, amelyekre a pontos toxicitás értékeléséhez még szükség lehet: lipidelemzés, hormonok, sav-bázis egyensúly, methemoglobin- és kolineszteráz-aktivitás mérése.

Ahol a megfigyelt hatások vizsgálatának kiterjesztéséhez szükséges, további klinikai-kémiai vizsgálatokat is lehet végezni.

d) Vizeletelemzésre általában nincs szükség, csak akkor, ha a várt vagy megfigyelt toxicitás ezt indokolja.

Ha a korábbi kísérletekből származó adatok nem megfelelőek, mérlegelendő a hematológiai és klinikai-kémiai paraméterek meghatározása az adagolás megkezdése előtt.

Autopszia

Minden állaton teljes körű makroszkópos boncolást kell végezni, amely a test külső felületének, a testnyílásoknak, valamint a koponya-, mell- és hasüregnek, illetve a bennük található szerveknek a feltárásából és vizsgálatából áll. A májat, a veséket, a mellékveséket és a heréket a kimetszés után minél előbb még nedvesen le kell mérni, a kiszáradás elkerülése miatt. Az alábbi szerveket kell megfelelő közegben tartósan tárolni egy esetleges későbbi kórszövettani vizsgálat céljaira: valamennyi olyan szerv, amelyen makroszkopikus elváltozás található, az agy – beleértve a nyúltagy, a híd, a kisagykéreg, a nagyagykéreg és az agyalapi mirigy metszeteit, a pajzsmirigy és a mellékpajzsmirigy, bármilyen jelen levő csecsemőmirigy, a légcső és a tüdő, a szív, az aorta, (a nyálmirigyek), a máj, a lép, a vesék, a mellékvesék, a hasnyálmirigy, az ivarmirigyek, a méh, (a járulékos nemi szervek), az epehólyag, ha megtalálható, a nyelőcső, a gyomor, a patkóbél, az éhbél, a csípőbél, a vakbél, a vastagbél, a végbél, a húgyhólyag, a reprezentatív nyirokcsomók, (a női emlőmirigy), (a combizomzat), a perifériás idegek, (a szemek), (a szegycsont a csontvelővel), (a combcsont az ízületi felülettel együtt), (a gerincoszlop három szinten – nyaki, mellkasközéptáji és ágyéki csigolyáknál), valamint (a szemüregen kívüli könnymirigyek). A zárójelben említett szöveteket csak akkor kell megvizsgálni, ha célszervként szerepelnek, illetve, ha a toxicitás tünetei ezt indokolják.

Kórszövettani vizsgálatok

a) Teljes körű kórszövettani vizsgálatot kell végezni a kontrollcsoport és a legnagyobb adaggal kezelt csoport állatainak bőrén, szervein és szövetein.

b) Az összes olyan szervet, amelyen makroszkopikus elváltozás található, meg kell vizsgálni.

c) A többi dóziscsoport állatainak célszerveit is meg kell vizsgálni.

d) Ha patkányokat használunk, a kis, illetve közepes dózissal kezelt csoportok állatainak tüdejét kórszövettani vizsgálatnak kell alávetni a fertőzés jeleit keresve, ez ugyanis az állat egészségi állapotának alkalmas értékelésére szolgál. E csoportok állatainál további kórszövettani vizsgálatokra rutinszerűen nincs szükség, de minden esetben vizsgálatokat kell végezni az olyan szerveken, amelyek az elváltozás jeleit mutatták a legnagyobb dózissal kezelt csoportban.

e) Ha kísérő csoportot is használunk, azokon a szöveteken és szerveken, amelyek a kezelt csoportokban elváltozásokat mutattak, itt is el kell végezni a kórszövettani vizsgálatokat.

2. ADATOK

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, amely minden vizsgálati csoportban megadja az állatok számát a vizsgálat kezdetén, az elváltozásokat mutató állatok számát, valamint az elváltozások egyes típusait, illetve az elváltozást mutató állatok százalékos arányát. Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni. Bármely elfogadott statisztikai módszer használható.

([1]) Ma szérum alanin aminotranszferáz néven ismert.
([2]) Ma szérum aszparaginsav aminotranszferáz néven ismert.

3. **ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. **Vizsgálati jelentés**

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– használt faj, törzs, az állatok származása, tartási körülmények, étrend,
– vizsgálati körülmények,
– adagolás (beleértve a vivőanyagot is, ha van) és koncentrációk,
– a toxikus reakciók nemenként és dózisonként,
– lehetőség szerint az a szint, amikor még nincs toxikus hatás,
– az elpusztulás ideje a vizsgálat során, illetve, hogy az állatok megélték-e a vizsgálat végét,
– a toxikus és más hatások leírása,
– az egyes mérgezési tünetek megfigyelésének időpontja és a megfigyelést követő változásuk,
– a takarmány fogyasztásával és a testsúly változásával kapcsolatos adatok,
– szemészeti leletek,
– az elvégzett hematológiai vizsgálatok és azok valamennyi eredménye,
– az elvégzett klinikai-kémiai vizsgálatok és azok valamennyi eredménye (beleértve az esetleges vizeletelemzés eredményeit is),
– boncolási leletek,
– a kórszövettani vizsgálatok eredményének részletes ismertetése,
– az eredmények statisztikai feldolgozása, ahol lehetséges,
– az eredmények megvitatása,
– az eredmények értelmezése.

3.2. **Értékelés és értelmezés**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

SZUBKRÓNIKUS INHALÁCIÓS TOXICITÁSVIZSGÁLAT

90 NAPOS, ISMÉTELT INHALÁCIÓS ADAGOLÁSÚ VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓ FAJOKON

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. Referenciaanyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

Több kísérleti állatcsoportot naponta, meghatározott ideig kezelünk a vizsgált anyaggal, fokozatosan növelt koncentrációkban, csoportonként egy koncentráció felhasználásával, 90 napon keresztül. Ha vivőanyagot alkalmazunk a vizsgált anyag megfelelő koncentrációjának kialakításához a levegőben, a vivőanyaghoz is kell kontrollcsoportot beállítani. A vizsgálati időszak alatt az állatokat naponta vizsgálni kell a mérgezés jeleinek észlelése érdekében. A vizsgálat ideje alatt elpusztult állatokat fel kell boncolni, a vizsgálat lezárásakor pedig a túlélő állatokat is el kell pusztítani és fel kell boncolni.

1.5. Minőségi követelmények

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

Előkészületek

Az állatokat a vizsgálat előtt legalább öt napon keresztül a vizsgálat tartási és takarmányozási körülményei között kell tartani. Az egészséges, fiatal állatokat a vizsgálat megkezdése előtt véletlenszerű kiválasztással kezelt és kontrollcsoportokba kell beosztani. Szükség esetén vivőanyag alkalmazható a vizsgált anyag megfelelő koncentrációjának kialakítására a levegőben. Ha az adagolás megkönnyítésére vivőanyagot vagy más adalékanyagot használunk, meg kell bizonyosodni arról, hogy azok nem rendelkeznek toxikus hatással. Ehhez szükség szerint korábbi vizsgálatokból származó adatokat is fel lehet használni.

Vizsgálati körülmények

A kísérlethez felhasznált állatok

Ha nincs ellenjavallat, patkányt kell kísérleti állatnak használni. Fiatal, egészséges, ivarérett, kísérleti célokra tenyésztett laboratóriumi állattörzsekből származó állatokat kell alkalmazni. A vizsgálat kezdetén az állatok súlya lehetőleg csak minimálisan térjen el egymástól, az átlagos értéktől legfeljebb ± 20 %-kal különbözhet. Ha a szubkrónikus inhalációs vizsgálatot valamely hosszú távú vizsgálat előzményeként végezzük el, mindkét vizsgálathoz ugyanazon fajt, illetve kísérleti állattörzset kell felhasználni.

Az állatok száma és neme

Valamennyi expozíciós koncentrációszinthez legalább 20 állatot kell felhasználni (10 hímet és 10 nőstényt). A nőstényeknél követelmény, hogy nem lehetnek leellettek vagy vemhesek. Ezenkívül még egy 20 fős (nemenként 10 állat) kísérő állatcsoportot is lehet kezelni a legnagyobb adaggal 90 napon át, amelynek állatain a kezelés után 28 nappal megfigyelhetővé válik a toxikus hatás visszafordíthatósága, elhúzódó vagy késve fellépő volta.

Expozíciós koncentrációszintek

Legalább három koncentrációt és egy kontrollt, illetve vivőanyagkontrollt kell használni (a legnagyobb koncentrációhoz tartozó vivőanyag-koncentrációval), ha vivőanyagot is alkalmaznak. A vizsgált anyaggal történő kezelést kivéve a kontrollcsoportban lévő állatokkal pontosan ugyanolyan módon kell bánni, mint a vizsgálati csoportok állataival. A legnagyobb adagot úgy kell kiválasztani, hogy annak hatására az azzal kezelt csoportban jelentkezzenek a toxikus hatások, de elhullások lehetőleg ne, vagy csak minimális mértékben legyenek. A legkisebb adagot úgy kell kiválasztani, hogy az ne okozzon toxikus tüneteket. Ha használható becslés áll rendelkezésre az emberi expozícióra vonatkozóan, a legkisebb adagnak ennél nagyobbnak kell lennie. Kedvező esetben a középső adaggal kezelt csoportnál minimális toxikus hatás észlelhető. Ha egynél több közbeeső dózist alkalmaznak, akkor azokat úgy kell kiválasztani, hogy fokozódó toxikus hatást váltsanak ki. Az alacsony és közbeeső dózissal kezelt csoportokban, illetve a kontrollcsoportban az elpusztult állatok száma minimális legyen, hogy az eredmények értelmezhető értékelése lehetséges legyen.

Expozíciós idő

Az expozíció napi időtartama a kamra koncentrációjának kiegyenlítését követően hat óra. Különleges követelmények esetén ettől eltérő expozíciós idők is alkalmazhatók.

Berendezés

A kísérlethez olyan inhalációs berendezést kell használni, amely óránként legalább tizenkét alkalommal légcserét tesz lehetővé a dinamikus légmozgás fenntartása érdekében azért, hogy megfelelő oxigéntartalmat és egyenletesen eloszlatott expozíciós atmoszférát lehessen biztosítani. Ha kamrát használnak, annak kialakítása révén a lehető legkisebbre kell csökkenteni a vizsgálati állatok zsúfoltságát, és lehetővé kell tenni a lehető legnagyobb mértékű expozíciót a vizsgált anyag belégzése útján. Általános szabályként a kamra atmoszférája stabilitásának biztosítása érdekében a vizsgálati állatok teljes térfogata nem haladhatja meg a vizsgálati kamra térfogatának 5 %-át. Végezhetők csak az orron és szájon át vagy csak a fejen át, illetve az egész testen keresztül megvalósuló egyedi expozíciós kamrai vizsgálatok; az első két módszer előnye, hogy minimalizálja a vizsgált anyag egyéb úton történő felvételének lehetőségét.

Megfigyelési időszak

A vizsgálati állatokat a teljes kezelési és gyógyulási időszak alatt naponta meg kell figyelni a toxicitás jeleinek észlelése érdekében. Fel kell jegyezni az elpusztulás időpontját és azt az időpontot, amikor a toxikus hatások jelei mutatkozni kezdenek, illetve elmúlnak.

A kísérlet végrehajtása

Ideális esetben heti öt-hét alkalommal teszik ki az állatokat a vizsgált anyag hatásának, 90 napon keresztül. A kísérő csoportokban a nyomon követő megfigyelésekre kiválasztott állatokat további 28 napig kell tartani kezelés nélkül, hogy a toxikus hatás visszafordíthatóságát, illetve elhúzódását ki lehessen mutatni. A vizsgálatokat 22 ± 3 °C állandó hőmérséklet mellett kell végezni. Ideális esetben a relatív páratartalmat 30 és 70 % között kell tartani, de bizonyos körülmények között (például aeroszolok vizsgálatakor) ez a gyakorlatban nem mindig kivitelezhető. A belégzési időszak alatt az állatok nem kaphatnak sem takarmányt, sem vizet.

Megfelelő analitikai koncentrációszabályozási rendszerrel kiegészített, dinamikus inhalációs rendszert kell alkalmazni. A megfelelő inhalációs koncentráció kialakításához javasolt a próbavizsgálat elvégzése. A légáramlást úgy kell beállítani, hogy az egész kamrában azonos expozíciós körülményeket biztosítson. A rendszernek biztosítania kell, hogy a kívánt expozíciós körülmények a lehető leggyorsabban kialakíthatók legyenek.

A következő paramétereket kell mérni, illetve figyelemmel kísérni:

a) a (folyamatos) légáramlás sebessége;

b) az anyag tényleges koncentrációja a belégzési zónában. A napi expozíciós időszak folyamán a koncentráció nem változhat a középérték ± 15 %-át meghaladó mértékben. Porok és aeroszolok esetében azonban ez az érték nem biztos, hogy elérhető, ezért itt szélesebb tartomány is elfogadható. A napi koncentrációt a vizsgálat teljes időtartama alatt lehetőség szerinti állandó értéken kell tartani. A kísérlet megtervezésekor részecskeméret-elemzést kell végezni az aeroszolkoncentráció stabilitásának meghatározására. Az expozíció során az elemzést olyan gyakran el kell végezni, amilyen gyakran szükséges, azért, hogy a részecskeeloszlás állandóságát ellenőrizni tudjuk.

c) hőmérséklet és páratartalom;

d) az expozíció ideje alatt és azt követően az állatokat rendszeresen kell megfigyelni, és a leleteket rögzíteni kell; minden állatról egyedi feljegyzés készül. Az összes állatot naponta meg kell vizsgálni, és a toxikus hatások megjelenését, súlyosságát és időtartamát rögzíteni kell. A ketrecben tartott állatok megfigyelésekor a bőr- és szőrelváltozásokra, a szemek és a nyálkahártyák változásaira, a légzési, a keringési rendszerre, az autonóm és a központi idegrendszer működésére, a szomatomotoros tevékenységekre, valamint a viselkedési mintákra kell figyelemmel lenni. Heti gyakorisággal mérni kell a takarmányfogyasztást és az állatok súlyát. Az állatok rendszeres megfigyelésére azért van szükség, hogy megelőzzük a kísérleti állatok kannibalizmus, szöveti autolízis, illetve rossz elhelyezés következtében történő elhullását. A vizsgálati időszak végeztével a kísérő csoportban lévő állatok kivételével minden túlélő állatot fel kell boncolni. A haldokló állatokat eltávolításuk után el kell pusztítani, és fel kell boncolni.

Az alábbi vizsgálatokat rendszeresen el kell végezni az összes állaton, beleértve a kontrollcsoport egyedeit is:

a) Lehetőleg minden állatot, de legalább a legnagyobb adaggal kezelt és a kontrollcsoportban lévő állatokat szemvizsgálatnak kell alávetni szemtükör vagy ezzel egyenértékű, megfelelő készülék segítségével az expozíciót megelőzően és a vizsgálat végeztével. Ha a szemen elváltozás észlelhető, akkor minden állatot meg kell vizsgálni.

b) A vizsgálati időszak végén hematológiai vizsgálatokat kell végezni: a hematokrit-értéket, a hemoglobin koncentrációt, a vörösvértestszámot, a minőségi- és a teljes fehérvérsejtszámot, az alvadási képességet, beleértve az alvadási időt, a protrombin időt, a tromboplasztin időt, illetve a trombocitaszámot kell mérni.

c) A vizsgálati időszak végeztével a vérmintákat klinikai-kémiai vizsgálatoknak is alá kell vetni. Fontosnak megvizsgálni az elektrolit-egyensúlyt, a szénhidrát-anyagcserét, a máj-, illetve a vesefunkciót. Az egyes vizsgálatok kiválasztását a vizsgált anyag hatásmechanizmusával kapcsolatos megfigyelések befolyásolják. Javasolt meghatározni: a kalcium, a foszfor, a klorid, a nátrium, a kálium szintjét, éhgyomorra kell mérni a glükóz szintjét (az adott fajra jellemző és megfelelő éheztetési idő után); a szérum glutaminsav szőlősav transzamináz (GPT) ([1]), a szérum glutaminsav oxálsav transzamináz (GOT) ([2]), az ornitin dekarboxiláz, a gamma glutamil-transzpeptidáz, a karbamid nitrogén, az albumin, a kreatinin, az összes bilirubin és az összes szérumfehérje szintjét szintén meg kell határozni. További meghatározások, amelyekre a pontos toxicitás értékeléséhez még szükség lehet: lipidelemzés, hormonok, sav-bázis egyensúly, methemoglobin- és kolineszteráz-aktivitás mérése. Ahol a megfigyelt hatások vizsgálatának kiterjesztéséhez szükséges, további klinikai-kémiai vizsgálatokat is lehet végezni.

d) Vizeletelemzésre általában nincs szükség, csak akkor, ha a várt vagy megfigyelt toxicitás ezt indokolja.

Ha a korábbi kísérletekből származó adatok nem megfelelőek, mérlegelendő a hematológiai és klinikai-kémiai paraméterek meghatározása az adagolás megkezdése előtt.

Autopszia

Minden állaton teljes körű makroszkópos boncolást kell végezni, amely a test külső felületének, a testnyílásoknak, valamint a koponya-, mell- és hasüregnek, illetve a bennük található szerveknek a feltárásából és vizsgálatából áll. A májat, a veséket, a mellékveséket és a heréket a kimetszés után minél előbb még nedvesen le kell mérni, a kiszáradás elkerülése miatt. Az alábbi szerveket kell megfelelő közegben tartósan tárolni egy esetleges későbbi kórszövettani vizsgálat céljaira: valamennyi olyan szerv, amelyen makroszkopikus elváltozás található, a tüdőket teljesen és sértetlenül kell eltávolítani, megmérni, majd megfelelő fixálóanyaggal konzerválni azért, hogy a szerkezete épen maradjon (megfelelő módszernek tekinthető a fixáló anyagnak a tüdőn való átáramoltatása), az orr és a garat szövetei, az agy – beleértve a nyúltagy, a híd, a kisagykéreg, a nagyagykéreg, és az agyalapi mirigy metszeteit, a pajzsmirigy és a mellékpajzsmirigy, bármilyen jelen levő csecsemőmirigy, a légcső és a tüdő, a szív, az aorta, a nyálmirigyek, a máj, a lép, a vesék, a mellékvesék, a hasnyálmirigy, az ivarmirigyek, a méh, (a járulékos nemi szervek), (bőr) epehólyag (ha van), a nyelőcső, a gyomor, a patkóbél, az éhbél, a csípőbél, a vakbél, a vastagbél, a végbél, a húgyhólyag, a reprezentatív nyirokcsomók, (a női emlőmirigy), (a combizomzat), a perifériás idegek, (szemek), a szegycsont a csontvelővel, (a szemek), (a combcsont az ízületi felülettel együtt), (a gerincoszlop három szinten – nyaki, mellkasközéptáji és ágyéki csigolyáknál). A zárójelben említett szöveteket csak akkor kell megvizsgálni, ha célszervként szerepelnek, illetve, ha a toxicitás tünetei ezt indokolják.

Kórszövettani vizsgálatok

a) Teljes körű kórszövettani vizsgálatot kell végrehajtani a kontrollcsoport és a legnagyobb adaggal kezelt csoport állatainak légzőszervein, valamint egyéb szervein és szövetein.

b) Az összes olyan szervet, amelyen makroszkopikus elváltozás található, meg kell vizsgálni.

c) A többi dóziscsoport állatainak célszerveit is meg kell vizsgálni.

d) Az alacsony és középső dózissal kezelt csoportok állatainak tüdejét kórszövettani vizsgálatnak kell alávetni azért, hogy az állatok egészségi állapota felmérhető legyen. E csoportok állatainál további kórszövettani vizsgálatokra rutinszerűen nincs szükség, de minden esetben vizsgálatokat kell végezni az olyan szerveken, amelyek az elváltozás jeleit mutatták a legnagyobb dózissal kezelt csoportban.

e) Ha kísérő csoportot is használunk, azokon a szöveteken és szerveken, amelyek a kezelt csoportokban elváltozásokat mutattak, itt is el kell végezni a kórszövettani vizsgálatokat.

([1]) Ma szérum alanin aminotranszferáz néven ismert.
([2]) Ma szérum aszparaginsav aminotranszferáz néven ismert.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, amely minden vizsgálati csoportban megadja az állatok számát a vizsgálat kezdetén, az elváltozásokat mutató állatok számát, valamint az elváltozások egyes típusait, illetve az elváltozást mutató állatok százalékos arányát. Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni. Bármely elfogadott statisztikai módszer használható.

3. **ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. **Vizsgálati jelentés**

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– használt faj, törzs, az állatok származása, tartási körülmények, étrend,

– vizsgálati körülmények:

Az expozíciós készülék leírása: beleértve a készülék konstrukcióját, típusát, méreteit, a levegő forrását, a részecskék és aeroszolok előállítására szolgáló rendszert, a klímarendszert, az elhasznált levegő kezelésének módját, az állatoknak a vizsgálati kamrában való elhelyezését. A hőmérsékletet, a levegő páratartalmát, és adott esetben az aeroszolkoncentráció stabilitását, illetve a részecskenagyságot le kell írni.

Expozíciós adatok: ezeket táblázatos formában kell közölni, az átalagértékek és az azoktól való eltérés megjelölésével. A következő adatokat kell tartalmazniuk:

a) légáram sebessége az inhalációs készülékben;

b) hőmérséklet és a levegő páratartalma;

c) névleges koncentráció (az inhalációs készülékbe helyezett vizsgált anyag összmennyisége osztva a levegő térfogatával);

d) vivőanyag jellege (ha van);

e) tényleges koncentráció a belégzési zónában;

f) átlagos részecskenagyság (amennyiben szükséges),

– a toxikus reakciók nemenként és dózisonként,

– lehetőség szerint az a szint, amikor még nincs toxikus hatás,

– az elpusztulás ideje a vizsgálat során, illetve, hogy az állatok megélték-e a vizsgálat végét,

– a toxikus és más hatások leírása,

– az egyes mérgezési tünetek megfigyelésének időpontja és a megfigyelést követő változásuk,

– a takarmány fogyasztásával és a testsúly változásával kapcsolatos adatok,

– szemészeti leletek,

– az elvégzett hematológiai vizsgálatok és azok valamennyi eredménye,

– az elvégzett klinikai-kémiai vizsgálatok és azok valamennyi eredménye (beleértve az esetleges vizeletelemzés eredményeit is),

– boncolási leletek,

– a kórszövettani vizsgálatok eredményének részletes ismertetése,

– az eredmények statisztikai feldolgozása, ahol lehetséges,

– az eredmények megvitatása,

– az eredmények értelmezése.

3.2. **Értékelés és értelmezés**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

TERATOGENITÁSI VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓ ÉS NEM RÁGCSÁLÓ FAJOKON

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2 Fogalommeghatározások

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. Referenciaanyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A vizsgált anyagot naponta orálisan (szájon át), fokozatos adagokban vagy koncentrációkban kell beadni több, vemhes vizsgálati állatcsoportnak, legalább a vemhességi időszaknak azon szakaszában, amikor a szervek kifejlődnek, 90 napon keresztül. Nem sokkal az ellés várt időpontja előtt az anyaállatokat el kell pusztítani, a méhet el kell távolítani, és tartalmát meg kell vizsgálni. A vizsgálati módszer az embrionális és magzati toxicitás vizsgálatára alkalmas.

1.5. Minőségi követelmények

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

Előkészületek

Egészséges, fiatal, fejlett, hasonló méretű és korú fiatal, szűz állatokat a vizsgálat előtt legalább öt napon keresztül a vizsgálat tartási és takarmányozási körülményei között kell tartani, majd bizonyítottan termékeny hímekkel kell pároztatni azokat. A megtermékenyített nőstényeket véletlenszerű kiválasztással kezelt csoportokba osztjuk be.

A megtermékenyítés természetes vagy mesterséges úton egyaránt végezhető. A vizsgált anyagot a beágyazódás után hamarosan kell elkezdeni napi gyakorisággal adagolni a nőstényeknek, és azt folytatni szükséges a szervek kifejlődésének teljes időszakán keresztül. Az ellés előtt egy nappal a magzatokat a méh kivétele útján el kell távolítani, és meg kell vizsgálni a szervek, illetve a csontváz rendellenességeit, beleértve a növekedésben való visszamaradást, a késleltetett csontképződést és a bélvérzéseket.

Vizsgálati körülmények

A kísérlethez felhasznált állatok

A leggyakrabban használt fajok a patkány, az egér, a hörcsög és a nyúl. A legalkalmasabb a patkány és a nyúl. A vizsgálatokhoz a szokásos laboratóriumi törzseket használjuk. Az alkalmazott törzsnek megfelelő termékenységgel kell rendelkeznie, és a teratogén hatásokkal szembeni érzékenységének ismertnek kell lennie. Az állatokat egyesével kell elhelyezni a ketrecekben.

Az állatok száma és neme

Minden adagolási szinthez legalább 20 vemhes patkányt, hörcsögöt, illetve egeret vagy 12 nyulat alkalmazunk. A cél az, hogy megfelelő számú almot, illetve utódot hozzunk létre az anyag teratogén potenciáljának felméréséhez.

Adagolási szintek (dózisok)

Legalább három adagolási szintet (dózist) és egy kontrollt kell használni. Ha a vizsgált anyagot vivőanyag segítségével adagolják, a vivőanyagra is kell egy kontrollcsoportot használni. Ha vivőanyagot is használnak, annak ismerni kell a toxikológiai jellemzőit; nem lehet teratogén, illetve nem lehet hatással a szaporodásra. A vizsgált anyaggal történő kezelést kivéve a kontrollcsoportban lévő állatokkal pontosan ugyanolyan módon

kell bánni, mint a vizsgálati csoportok állataival. Ha a vizsgált anyag biológiai, illetve fizikokémiai tulajdonságai lehetővé teszik, a legnagyobb adaggal kezelt csoportban ugyan jelentkeznie kell enyhe toxikus hatásnak az anyaállatokon, például enyhe súlyveszteségnek, de 10 %-nál több elhullás lehetőleg ne legyen e csoportban sem. A legalacsonyabb adaggal kezelt csoportban nem lehetnek felismerhető, a vizsgált anyaggal összefüggésben lévő jelek. A közbeeső csoportok adagjainak nagyságát a legkisebb és legnagyobb adag között pontosan középen kell kijelölni.

Határérték-vizsgálat

Alacsony toxicitású vizsgálati anyagoknál, ha a napi 1 000 mg/testsúlykilogramm adagolás nem eredményez embrionális toxicitást vagy teratogenitást, a további vizsgálatok szükségtelennek tekinthetők.

Expozíciós idő

A vizsgálat nulladik napja az a nap, amikor a hüvelyi dugó és/vagy a sperma megfigyelhető (ha lehetséges). Az adagolási időszaknak ki kell terjednie a szervképződési időszakra. Ez a patkány és az egér esetében 6–15 nap, a hörcsögnél 6–14 nap, a nyúlnál 6–18 nap. Ha a nulladik nap alapja a párzás megfigyelése vagy a mesterséges megtermékenyítés, a fent megadott napokat egy nap hozzáadásával kell korrigálni. Választhatóan az adagolási időszak is meghosszabbítható, megközelítőleg a várt ellési nap előtti utolsó napig.

Megfigyelési időszak

Legalább naponta egyszer gondos klinikai vizsgálatokat kell végezni. Az állatok napi megfigyelése azért is szükséges, hogy minél kevesebb állat pusztuljon el a vizsgálat időtartama alatt.

A kísérlet végrehajtása

A vizsgált anyagot szájon át vagy gyomorszondával kell beadni. A vizsgált anyagot naponta megközelítőleg azonos időben kell beadni.

A nőstény vizsgálati állatokat naponta kell kezelni a vizsgált anyaggal, az egész vizsgálat ideje alatt. A vizsgált anyag adagolásának elején az adag nagyságát lehet a nőstények testsúlyához viszonyítani, vagy – tekintettel a vemhesség során tapasztalható gyors súlynövekedésre – az állatokat időközönként lehet mérni, és az adagot ennek megfelelően a legutóbbi súlymeghatározás szerint kell beállítani. A toxicitásra utaló jeleket meg kell figyelni, és fel kell jegyezni megjelenésük időpontját, súlyosságát és az időtartamot. A vetélés vagy koraszülés jeleit mutató nőstényeket el kell pusztítani, és alapos makroszkópos vizsgálatnak kell alávetni. A kezelés utáni megfigyelési időszakot megközelítőleg az ellés előtti utolsó napig kell folytatni; a cél a vemhességi időszak legnagyobb részének lefedése, lehetőleg el kell azonban kerülni az eredmények értékelésének bizonytalanságait a természetes ellést követően felmerülő komplikációk eredményeként. A ketrecben tartott állatok megfigyelésekor a bőr- és szőrelváltozásokra, a szemek és a nyálkahártyák változásaira, valamint a légzési, a keringési rendszerre, az autonóm és a központi idegrendszer működésére, a szomatomotoros tevékenységekre, valamint a viselkedési mintákra kell figyelemmel lenni. Hetente mérni kell a takarmányfogyasztást (és a vízfogyasztást is, ha a vizsgált anyagot az ivóvízzel adagoljuk), valamint az állatok súlyát.

Autopszia

Minden anyaállatot, amely a vizsgálat alatt, illetve azt követően elpusztul, makroszkóposan alaposan meg kell vizsgálni anatómiai elváltozások, illetve olyan patológiai elváltozások szempontjából, amelyek befolyással lehettek a vemhességre. Közvetlenül a halál után el kell távolítani a méhet, és annak tartalmát meg kell vizsgálni magzati vagy embrionális elhalálozás, valamint az élő magzatok száma szempontjából. Rendszerint megbecsülhető a méhen belüli elhalás ideje, ha ilyen előfordul. Patkányban és nyúlban meg lehet számolni a sárgatesteket is. Meg kell állapítani a magzatok nemét, és egyedileg meg kell mérni azokat, súlyukat fel kell jegyezni, és ebből átlagos magzati súlyt kell számolni. Az eltávolítást követően minden magzatot egyedileg külső vizsgálatnak kell alávetni. Patkányok, egerek és hörcsögök esetében az alom egyharmadát, legfeljebb felét preparálni kell, meg kell vizsgálni azokat a csontváz elváltozásai szempontjából, míg az almok fennmaradó részénél megfelelő módszerek alkalmazásával meg kell vizsgálni a lágy szövetek elváltozásait. A nyulaknál minden egyes magzatot gondos boncolással vizsgáljunk meg zsigeri elváltozások, majd a csontváz eltérései szempontjából.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, amely minden vizsgálati csoportban megadja az állatok számát a vizsgálat kezdetén, az elváltozásokat mutató állatok számát, valamint az elváltozások egyes típusait, illetve az elváltozást mutató állatok százalékos arányát. Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni. Bármely elfogadott statisztikai módszer használható.

3. **ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. **Vizsgálati jelentés**

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:
– használt faj, törzs, az állatok származása, tartási körülmények, étrend,
– vizsgálati körülmények,
– adagolás (beleértve a vivőanyagot is, ha van) és koncentrációk,
– a toxikus reakciók dózisonként,
– lehetőség szerint az a szint, amikor még nincs toxikus hatás,
– az elpusztulás ideje a vizsgálat során, illetve, hogy az állatok megélték-e a vizsgálat végét,
– a toxikus és más hatások leírása,
– az egyes mérgezési tünetek megfigyelésének időpontja és a megfigyelést követő változásuk,
– a takarmány fogyasztásával és a testsúly változásával kapcsolatos adatok,
– a vemhesség időtartama és az alommal kapcsolatos adatok (történeti adatok is),
– magzati adatok (élő/halva születés, nem, a lágyszövet vagy a csontváz elváltozásai),
– alomadatok (élő/halva születés, nem, a lágyszövet és csontváz elváltozásai almonként),
– az eredmények statisztikai feldolgozása, ahol lehetséges,
– az eredmények megvitatása,
– az eredmények értelmezése.

3.2. **Értékelés és értelmezés**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

KRÓNIKUS TOXICITÁSVIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. Referenciaanyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A vizsgált anyagot rendszerint heti hét alkalommal, a megfelelő módon, fokozatos adagokban kell beadni több, nem rágcsáló vizsgálati állatcsoportnak, élettartamuk jelentős részén keresztül. Az expozíció alatt és után az állatokat a toxikus hatás jeleinek észlelése érdekében naponta meg kell vizsgálni.

1.5. Minőségi követelmények

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

Előkészületek

Az állatokat a vizsgálat előtt legalább öt napon keresztül a vizsgálat tartási és takarmányozási körülményei között kell tartani. Az egészséges, fiatal állatokat a vizsgálat megkezdése előtt véletlenszerű kiválasztással kezelt és kontrollcsoportokba kell beosztani.

Vizsgálati körülmények

A kísérlethez felhasznált állatok

Ajánlott faj a patkány. A korábban végzett vizsgálatok eredményeire alapozva egyéb, rágcsáló vagy nem rágcsáló fajokat is lehet használni. Fiatal, egészséges, ivarérett, kísérleti célokra tenyésztett laboratóriumi állattörzsekből származó állatokat kell alkalmazni, az adagolást pedig a szoptatás utáni elválasztást követően minél előbb meg kell kezdeni.

A vizsgálat kezdetén az állatok súlya lehetőleg csak minimálisan térjen el egymástól, az átlagos értéktől legfeljebb ± 20 %-kal különbözhet. Ha a szubkrónikus orális vizsgálatot valamely hosszú távú vizsgálat előzményeként végzik, mindkét vizsgálathoz ugyanazon fajt, illetve kísérleti állattörzset kell felhasználni.

Az állatok száma és neme

Rágcsálók esetében minden adagolási szinthez, valamint a hozzájuk tartozó kontrollcsoporthoz legalább 40 állatot kell felhasználni (20 hímet és 20 nőstényt). A nőstényeknél követelmény, hogy nem lehetnek leellettek vagy vemhesek. Ha időközi elpusztítást tervezünk, akkor a létszámot annyival kell megnövelni, ahány állatot a vizsgálat befejezése előtt el akarunk pusztítani.

Nem rágcsáló fajoknál kisebb létszámú, de nemenként és csoportonként legalább négyfős csoportok is elfogadhatók.

Adagolási szintek (dózisok) és expozíciós gyakoriság

Legalább három adagolási szintet (dózist) és egy kontrollcsoportot kell használni. A legnagyobb adagot úgy kell kiválasztani, hogy annak hatására a kezelt csoportban jelentkezzenek a toxicitás jelei, de ne legyen túlzott mértékű elhullás. A legkisebb adagot úgy kell kiválasztani, hogy az ne okozzon toxikus tüneteket.

A közbeeső csoportok adagjainak nagyságát a legkisebb és legnagyobb adag között pontosan középen kell kijelölni.

Az adagolási szintek kiválasztásánál figyelembe kell venni a korábbi kísérletekből származó adatokat.

Az expozíciót rendszerint naponta ismételjük. Ha a vizsgált anyagot ivóvízzel adjuk be, illetve a takarmányba keverjük, akkor azoknak folyamatosan az állatok rendelkezésére kell állniuk.

Kontrollcsoportok

A vizsgált anyaggal történő kezelést kivéve a kontrollcsoportban lévő állatokkal pontosan ugyanolyan módon kell bánni, mint a vizsgálati csoportok állataival.

Különleges körülmények között, például aeroszolokat is alkalmazó inhalációs vizsgálatban vagy nem ismert biológiai aktivitással rendelkező emulzióképző anyag szájon át történő adagolásakor egy kezeletlen kontrollcsoportra is szükség van, amelynek állatai nem kerülnek kapcsolatba a vivőanyaggal.

Az adagolás módja

Az adagolás két fő módon történhet: szájon át, illetve belélegeztetéssel. Az adagolás módjának megválasztása függ a vizsgált anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól, valamint az emberi expozíció valószínűsített módjától.

A dermális adagolás alkalmazása jelentős gyakorlati problémákat vet fel. A bőrön át történő felszívódás révén kialakuló krónikus szisztémás toxicitásra vonatkozóan rendszerint következtetni lehet valamely más adagolási mód, például az orális adagolás eredményeiből, valamint korábbi, a bőrön át történő felszívódást vizsgáló egyéb vizsgálatok tapasztalataiból.

Vizsgálatok orális adagolással

Ha a vizsgált anyag felszívódik a gyomor-bél rendszerből, és ha a táplálékfelvétel az esetleges emberi expozíció egyik módja, akkor a szájon át történő adagolás a választandó módszer, hacsak ellenjavallata nincs.

Az állatok az anyagot a takarmánnyal, az ivóvízben oldva, illetve kapszulában kapják.

Ideális esetben az anyagot naponta kell adagolni a hét mind a hét napján, miután az ötnapos rendszerű adagolás gyógyulással vagy a toxikus tünetek megszűnésével járhat a kimaradó időszakban, és így befolyásolhatja az eredményeket és azok értékelését. Ám főként gyakorlati megfontolások alapján az ötnapos adagolási hét is elfogadhatónak tekintendő.

Vizsgálatok inhalációs adagolással

Miután a belégzéses vizsgálatok sokkal összetettebb technikai problémákat jelentenek, mint az adagolás más módjai, az adagoláshoz itt sokkal részletesebb útmutatást adunk. Azt is megjegyezzük, hogy bizonyos körülmények között a közvetlen légcsőbe juttatás (instilláció) is érvényes módszer lehet.

A hosszú távú expozíció alapja rendszerint az emberi expozíció modellezése, ami két lehetőséget jelent. Az egyik lehetőségnek megfelelően a kamra-koncentráció kiegyenlítődését követően naponta hat órán keresztül lélegeztetik be az állatokkal a vizsgált anyagot heti öt napon keresztül (szakaszos expozíció), a másik lehetőség pedig a környezeti expozíciónak jobban megfelelő módszer, azaz napi 22–24 órán át, a hét minden napján végzett belélegeztetés (folyamatos expozíció), amelybe körülbelül egyórás napi megszakítás is beletartozik, mindennap ugyanazon időben, amikor az állatok megkapják a takarmányt, és amikor a kamrát karbantartjuk. Az állatok általában mindkét esetben állandó koncentrációnak vannak kitéve. A szakaszos és a folyamatos expozíció közötti alapvető különbség az, hogy az előbbiben van egy 17–18 órás időszak, amikor az állatok regenerálódhatnak a napi adag hatását követően, amelyet a hétvégeken egy még ennél is hosszabb regenerációs időszak követ.

A szakaszos, illetve folyamatos expozíció közötti választás a vizsgálat céljától és a szimulálni kívánt emberi helyzettől függ. Mindazonáltal figyelembe kell venni bizonyos technikai nehézségeket. Ilyen például, hogy a folyamatos expozíció előnyeit csökkentheti az ehhez szükséges itatás és etetés nehézsége, valamint a bonyolultabb (ugyanakkor megbízhatóbb) aeroszol- és páraképző berendezések, illetve a megfigyelő technikák igénye.

Expozíciós kamrák

A kísérlethez olyan inhalációs berendezést kell használni, amely óránként legalább tizenkét alkalommal légcserét tesz lehetővé a dinamikus légmozgás fenntartása érdekében, azért, hogy megfelelő oxigéntartalmat és egyenletesen eloszlatott expozíciós atmoszférát lehessen biztosítani. A kontroll és az expozíciós kamrák tervezésének, felépítésének azonosnak kell lennie, hogy a körülmények a vizsgált anyag belélegeztetését kivéve minden tekintetben összehasonlíthatók legyenek. A kamrában általában enyhe negatív nyomást kell fenntartani, hogy a vizsgált anyag ne szivároghasson ki a környezetbe. Ha kamrát használnak, annak kialakítása révén a lehető legkisebbre kell csökkenteni a kísérleti állatok zsúfoltságát. Általános szabályként a kamrai atmoszféra stabilitásának biztosítása érdekében a kísérleti állatok teljes térfogata nem haladhatja meg a vizsgálati kamra térfogatának 5 %-át.

A következő méréseket és ellenőrzéseket kell elvégezni:

i. Légáramlás: a légkamrán keresztül áramló levegő sebességét lehetőség szerint folyamatosan kell mérni;

ii. Koncentráció: a napi expozíciós időszak alatt a vizsgált anyag koncentrációjának változása nem haladhatja meg a középérték ± 15 %-át;

iii. Hőmérséklet és páratartalom: rágcsálóknál a vizsgálatokat 22 ± 2 °C kamrai hőmérsékleten és 30–70 % közötti relatív páratartalom mellett kell végezni, kivéve, amikor a vizsgált anyagot víz segítségével oszlatjuk el a kamra légterében. Lehetőleg mindkét értéket folyamatosan figyelemmel kell kísérni;

iv. A részecske nagyságának mérése: a folyékony és szilárd aeroszolt alkalmazó légkamrák légterében meg kell határozni a részecskék megoszlását. Az aeroszolrészecskéknek a felhasznált állatok számára belélegezhető nagyságúaknak kell lenniük. A légkamra mintáit az állatok légzési zónájából kell venni. A légminta legyen az állattal belélegeztetett részecske megoszlására nézve reprezentatív, és gravimetrikusan az összes szuszpendált aeroszolt képviselje még akkor is, ha azok nagy része nem lélegezhető be az állat számára. A részecske méretének meghatározását a kísérleti rendszer kialakítása során gyakran el kell végezni az aeroszol stabilitásának ellenőrzésére, azután pedig olyan gyakran, amilyen mértékben szükséges a belélegeztetés során, hogy megfelelően meghatározhassuk az állatok expozíciójára alkalmazott részecskemegoszlás állandóságát.

A vizsgálat időtartama

Az adagolás időtartama nem lehet kevesebb 12 hónapnál.

A kísérlet végrehajtása

Megfigyelések

Naponta legalább egyszer minden állatot gondos klinikai vizsgálatnak kell alávetni. További napi megfigyelések is szükségesek, azért, hogy a vizsgálat során elhullott állatok száma a lehető legkevesebb legyen, például az elpusztult állatokat fel kell boncolni, vagy hűtve kell tárolni, illetve a gyenge vagy haldokló állatokat el kell különíteni, vagy el kell pusztítani. Gondos megfigyeléseket kell végezni valamennyi toxikus hatás megjelenésének és előrehaladásának észlelése, valamint a kannibalizmus, az autolízis, illetve betegség miatt bekövetkező veszteségek csökkentése érdekében.

A klinikai tüneteket, beleértve az idegrendszeri és szemészeti elváltozásokat, valamint a halálozást, minden állatnál fel kell jegyezni. Fel kell jegyezni a toxikus állapot kialakulásának kezdetét és előrehaladásának részleteit, a feltételezett daganatokat is beleértve.

Az állatok testsúlyát az első 13 hét során egyedileg, hetente kell mérni, ezt követően négyhetente legalább egyszer. A táplálkozást heti egy alkalommal kell ellenőrizni az első 13 hétben, majd megközelítőleg háromhavonta, hacsak az állatok egészségi állapota vagy testsúlyváltozása másként nem indokolja.

Hematológiai vizsgálat

A harmadik, illetve a hatodik hónap elteltével, majd ezt követően megközelítőleg félévente, valamint a vizsgálat végén valamennyi nem rágcsáló állatnál, valamint csoportonként/nemenként 10 patkánynál valamennyi vizsgálati csoportnál a levett vérmintákból hematológiai vizsgálatot (például hemoglobin-tartalom, hematokrit-érték, vörösvérsejtszám, teljes fehérvérsejtszám, trombocitaszám, illetve egyéb alvadási paraméterek) kell végezni. Ha lehetséges, minden mintát minden alkalommal ugyanattól a patkánytól kell venni. Ezenkívül a nem rágcsálóktól vizsgálat előtti mintát is kell venni.

Ha a klinikai megfigyelések az állatok egészségének romlására utalnak a vizsgálat során, az érintett állatoknál kvantitatív vérképvizsgálatot is kell végezni.

Szintén kvantitatív vérképvizsgálatot kell végezni a legnagyobb adaggal kezelt állatoknál és a kontrollcsoportban. A második legnagyobb adaggal kezelt csoportnál e vizsgálatot csak akkor kell elvégezni, ha jelentős különbség van a kontroll- és a legnagyobb adaggal kezelt csoport között, illetve ha a kórbonctani eredmények ezt indokolják.

Vizeletvizsgálat

Valamennyi nem rágcsáló állatnál és csoportonként/nemenként 10 patkánynál valamennyi vizsgálati csoportnál, lehetőség szerint ugyanazon patkányoktól, ugyanolyan időközönként, a vérvizsgálattal egy időben vizeletmintát is kell venni a vizeletvizsgálathoz. Egyedileg vagy rágcsálók esetében nemenként és csoportonként összesített mintákból az alábbi meghatározásokat kell elvégezni:

– külső megjelenés: térfogat és sűrűség, állatonként,

– fehérje, glükóz, keton, vér (szemikvantitatív meghatározás),

– az üledék mikroszkópos vizsgálata (szemikvantitatív meghatározás).

Klinikai kémia

Valamennyi nem rágcsáló állatnál és csoportonként/nemenként 10 patkánynál valamennyi vizsgálati csoportnál, lehetőség szerint minden alkalommal ugyanazon patkányoktól, megközelítőleg hathavonta, illetve a vizsgálati időszak végeztével vérmintákat kell venni klinikai kémiai vizsgálatok céljaira. Ezenkívül a nem rágcsálóktól vizsgálat előtti mintát is kell venni. A mintákból plazmát kell készíteni, és az alábbi meghatározásokat kell elvégezni:

– összfehérje-koncentráció,

– albuminkoncentráció,

– májfunkciós vizsgálatok (például alkalikusfoszfatáz-aktivitás, szérum glutaminsav szőlősav transzamináz [GPT] ([1]), szérum glutaminsav oxálsav transzamináz [GOT] ([2]) aktivitása), gamma glutamil-transzpeptidáz, ornitin dekarboxiláz,

– szénhidrát-anyagcsere, például éhgyomorra mért vércukorszint,

– vesefunkciós vizsgálatok, például karbamid a vérben.

Autopszia

Minden állaton teljes körű makroszkópos boncolást kell végezni, beleértve azokat is, amelyek a vizsgálat során pusztultak el, illetve amelyeket betegség miatt kellett elpusztítani. Az elpusztítás előtt az állatoktól kvantitatív vérképvizsgálat céljából vérmintát kell venni. Valamennyi szabad szemmel látható elváltozást, daganatot, illetve daganatgyanús elváltozást meg kell őrizni. Meg kell kísérelni a makroszkópos és mikroszkópos elváltozások közötti összefüggések feltárását.

Az összes szervet és szövetet el kell tenni későbbi kórszövettani vizsgálat céljaira. Ez rendszerint a következő szövetekre és szervekre vonatkozik: agy ([3]) (a nyúltagy/híd, a kisagykéreg, a nagyagykéreg), az agyalapi mirigy, a pajzsmirigy (a mellékpajzsmirigygyel együtt), a csecsemőmirigy, a tüdő (a légcsővel együtt), a szív, az aorta, a nyálmirigyek, a máj ([3]), a lép, a vesék ([3]), a mellékvesék ([3]), a nyelőcső, a gyomor, a patkóbél, az éhbél, a csípőbél, a vakbél, a vastagbél, a végbél, a méh, a húgyhólyag, a nyirokcsomók, a hasnyálmirigy, az ivarmirigyek ([3]), a járulékos nemi szervek, a női emlőmirigy, a bőr, az izomzat, a perifériás idegek, a gerincvelő (nyaki, háti, ágyéki), a szegycsont a csontvelővel és a combcsont (az ízületi felülettel együtt), valamint a szemek. A tüdő és a húgyhólyag megőrzésére a legjobb módszer a fixálóval való feltöltés. A tüdő folyadékkal való feltöltése az inhalációs vizsgálatoknál a megfelelő kórszövettani vizsgálat előfeltétele. Különleges, például inhalációs vizsgálatoknál a teljes légzőrendszert vizsgálni kell, az orral, a garattal és a gégefővel együtt.

Ha más klinikai vizsgálatok is történnek, a fenti eljárásokból nyert információknak a mikroszkópos vizsgálatokat megelőzően kell rendelkezésre állniuk, mert a patológus számára lényeges információkkal szolgálhatnak.

Kórszövettani vizsgálatok

Minden látható elváltozást, különösen a bármely szerven található daganatokat és más sérüléseket, mikroszkópos vizsgálatnak kell alávetni. Ezenkívül az alábbi eljárásokat ajánljuk:

a) Valamennyi tartósított szerv és szövet mikroszkópos vizsgálata az alábbi kísérleti állatoknál talált elváltozások teljes és részletes leírásával:

   1. valamennyi, a vizsgálat során elhullott vagy leölt állat;

   2. a nagy adaggal kezelt csoport és a kontrollcsoport valamennyi állata;

b) A vizsgált anyag által okozott, illetve feltehetően okozott rendellenességet mutató szervek és szövetek esetében az alacsonyabb adaggal kezelt csoportoknál is kell szövettani vizsgálatot végezni;

c) Ha a vizsgálat eredménye az állatok rendes élettartamának lényeges rövidülését mutatja, illetve olyan hatásokat jelez, amelyek valamely toxikus választ befolyásolhatnak, a fent leírtak szerint az eggyel kisebb adaggal kezelt csoportnál is el kell végezni a vizsgálatot;

d) A vizsgálat során felhasznált állatoknál normál körülmények között, hasonló laboratóriumi tartás mellett is előforduló elváltozásokkal kapcsolatos információ, vagyis a történeti kontrolladatok ismerete elengedhetetlenül szükséges ahhoz, hogy a kezelt állatokban megfigyelt változások jelentőségét helyesen értelmezzük.

([1]) Ma szérum alanin aminotranszferáz néven ismert.
([2]) Ma szérum aszparaginsav aminotranszferáz néven ismert.
([3]) E szervek súlyát – valamennyi nem rágcsálónál e körbe tartozik a pajzsmirigy és a mellékpajzsmirigy is – a rágcsálók esetében nemenként és csoportonként tíz állatnál, valamint nem rágcsálóknál minden állatnál mérni kell.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, amely minden vizsgálati csoportban megadja az állatok számát a vizsgálat kezdetén, az elváltozásokat mutató állatok számát, valamint az elváltozások egyes típusait, illetve az elváltozást mutató állatok százalékos arányát. Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni. Bármely elfogadott statisztikai módszer használható.

3. **ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. **Vizsgálati jelentés**

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– használt faj, törzs, az állatok származása, tartási körülmények, étrend,

– vizsgálati körülmények,

Az expozíciós készülék leírása:

beleértve a készülék konstrukcióját, típusát, méreteit, a levegő forrását, a részecskék és aeroszolok előállítására szolgáló rendszert, a klímarendszert, az elhasznált levegő kezelésének módját, az állatoknak a vizsgálati kamrában való elhelyezését. A hőmérsékletet, a levegő páratartalmát és adott esetben az aeroszolkoncentráció stabilitását, illetve a részecskenagyságot le kell írni.

Expozíciós adatok: ezeket táblázatos formában kell közölni, az átalagértékek és az azoktól való eltérés megjelölésével.

A következő adatokat kell tartalmazniuk:

a) légáram sebessége az inhalációs készülékben;

b) hőmérséklet és a levegő páratartalma;

c) névleges koncentráció (az inhalációs készülékbe helyezett vizsgált anyag összmennyisége osztva a levegő térfogatával);

d) vivőanyag jellege (ha van);

e) tényleges koncentráció a belégzési zónában;

f) átlagos részecskenagyság (amennyiben szükséges),

– adagolás (beleértve a vivőanyagot is, ha van) és koncentrációk,

– a toxikus reakciók nemenként és dózisonként,

– lehetőség szerint az a szint, amikor még nincs toxikus hatás,

– az elpusztulás ideje a vizsgálat során, illetve, hogy az állatok megélték-e a vizsgálat végét,

– a toxikus és más hatások leírása,

– az egyes mérgezési tünetek megfigyelésének időpontja és a megfigyelést követő változásuk,

– a takarmány fogyasztásával és a testsúly változásával kapcsolatos adatok,

– szemészeti leletek,

– az elvégzett hematológiai vizsgálatok és azok valamennyi eredménye,

– az elvégzett klinikai kémiai vizsgálatok és azok valamennyi eredménye (beleértve az esetleges vizeletelemzés eredményeit is),

– boncolási leletek,

– a kórszövettani vizsgálatok eredményének részletes ismertetése,

– az eredmények statisztikai feldolgozása, ahol lehetséges,

– az eredmények megvitatása,

– az eredmények értelmezése.

3.2. **Értékelés és értelmezés**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

A RÁKKELTŐ HATÁS VIZSGÁLATA

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. Referenciaanyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A vizsgált anyagot rendszerint heti hét alkalommal, a megfelelő módon, fokozatos adagokban kell adagolni a kísérleti állatcsoportoknak, élettartamuk jelentős részén keresztül. Az adagolási időszak alatt és után az állatokat a mérgező hatás jelei, különösen a daganatképződés észlelése érdekében naponta kell megvizsgálni.

1.5. Minőségi követelmények

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

Az állatokat a vizsgálat előtt legalább öt napon keresztül a vizsgálat tartási és takarmányozási körülményei között kell tartani. Az egészséges, fiatal állatokat a vizsgálat megkezdése előtt véletlenszerű kiválasztással kezelt és kontrollcsoportokba kell beosztani.

A kísérlethez felhasznált állatok

A javasolt állatfaj a patkány. A korábban végzett vizsgálatok eredményeire alapozva egyéb, rágcsáló vagy nem rágcsáló fajokat is lehet használni. Kísérleti célokra tenyésztett laboratóriumi állattörzsekből származó egészséges és fiatal állatokat használjunk, az adagolást pedig a szoptatás utáni elválasztást követően minél előbb meg kell kezdeni.

A vizsgálat kezdetén az állatok súlya lehetőleg csak minimálisan térjen el egymástól, az átlagos értéktől legfeljebb ± 20 %-kal különbözhet. Ha a szubkrónikus orális vizsgálatot valamely hosszú távú vizsgálat előzményeként végzik, mindkét vizsgálathoz ugyanazon fajt, illetve kísérleti állattörzset kell felhasználni.

Az állatok száma és neme

Rágcsálók esetében minden adagolási szintnél, valamint a hozzájuk tartozó kontrollcsoportnál legalább 100 állatot kell felhasználni (50 hímet és 50 nőstényt). A nőstényeknél követelmény, hogy nem lehetnek leellettek vagy vemhesek. Ha időközi elpusztítást terveznek, akkor a létszámot annyival kell megnövelni, ahány állatot a vizsgálat befejezése előtt el szándékoznak pusztítani.

Adagolási szintek (dózisok) és expozíciós gyakoriság

Legalább három adagolási szintet (dózist) és egy kontrollt kell használni. A legnagyobb adaggal kezelt csoportban jelentkeznie kell a toxikus hatásnak, például a súlynövekedés kismértékű (10 %-ot nem meghaladó) visszaesése formájában, anélkül hogy az a daganatos elváltozásokon kívül egyéb módon lényegesen megváltoztatná az életkilátásokat.

A legalacsonyabb adaggal kezelt csoportban a vizsgált anyag nem lehet hatással az állatok növekedésére, fejlődésére, illetve élettartamára, és nem okozhat toxikus tüneteket. E dózis általában nem lehet a legnagyobb dózis 10 %-ánál alacsonyabb.

A közbeeső csoportok adagjainak nagyságát a legkisebb és legnagyobb adag között pontosan középen kell kijelölni.

Az adagolási szinteket a korábbi toxicitásvizsgálatokat figyelembe véve kell megválasztani.

Az expozíciót rendszerint naponta ismételjük. Ha a vegyületet ivóvízzel vagy takarmányba keverve kell beadni, akkor azoknak folyamatosan az állatok rendelkezésére kell állnia.

Kontrollcsoportok

A kezelt csoporttal a vizsgált anyaggal való expozíció kivételével minden egyéb tekintetben azonos kontrollcsoportot kell használni.

Különleges körülmények között, például aeroszolokat is alkalmazó inhalációs vizsgálatban vagy nem jellemzett biológiai aktivitással rendelkező emulzióképző anyag szájon át történő adagolásakor egy további, kezeletlen kontrollcsoportra is szükség van, amelynek állatai nem kerülnek kapcsolatba a vivőanyaggal.

Az adagolás módja

Az adagolás három fő úton történhet: szájon át, bőrön át, illetve belélegeztetéssel. Az adagolás módjának megválasztása függ a vizsgált anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól, valamint az emberi expozíció valószínű módjától.

Vizsgálatok orális adagolással

Ha a vizsgált anyag felszívódik a gyomor-bél rendszerből, és ha a táplálékfelvétel az esetleges emberi expozíció egyik módja, akkor az orális adagolás a választandó módszer, hacsak ellenjavallata nincs. Az állatok a vizsgált anyagot a takarmánnyal, az ivóvízben oldva, illetve kapszulában kaphatják.

A legmegfelelőbb esetben az anyagot naponta kell adagolni a hét mind a hét napján, miután az ötnapos rendszerű adagolás gyógyulással vagy a toxikus tünetek megszűnésével járhat a kimaradó időszakban, és így befolyásolhatja az eredményeket és azok értékelését. Ám főként gyakorlati megfontolások alapján az ötnapos adagolási hét is elfogadhatónak tekintendő.

Vizsgálatok dermális expozícióval

A bőr ecsetelésével végzett expozíció olyan esetben választható, ha az az emberi expozíció fő módját szimulálja, illetve, ha bőrelváltozásokra akarunk modellrendszert felállítani.

Vizsgálatok inhalációs adagolással

Miután az inhalációs vizsgálatok sokkal összetettebb technikai problémákat jelentenek, mint az adagolás más módjai, az adagoláshoz itt sokkal részletesebb útmutatást adunk. Azt is megjegyezzük, hogy bizonyos körülmények között a közvetlen légcsőbe juttatás (instilláció) is érvényes módszer lehet.

A hosszú távú expozíció alapja rendszerint az emberi expozíció modellezése, ami két lehetőséget jelent. Az egyik lehetőségnek megfelelően a kamra-koncentráció kiegyenlítődését követően, naponta hat órán keresztül lélegeztetjük be az állatokkal a vizsgált anyagot heti öt napon keresztül (szakaszos expozíció), a másik lehetőség pedig a környezeti expozíciónak jobban megfelelő módszer, azaz napi 22–24 órán át, a hét minden napján végzett belélegeztetés (folyamatos expozíció), amelybe körülbelül egyórás napi megszakítás is beletartozik, mindennap ugyanazon időben, amikor is az állatok megkapják a takarmányt, és amikor a kamrát tisztítják. Az állatok általában mindkét esetben állandó koncentrációnak vannak kitéve.

A szakaszos és a folyamatos expozíció közötti alapvető különbség az, hogy az előbbiben van egy 17–18 órás időszak, amikor az állatok regenerálódhatnak a napi adag hatását követően, amelyet a hétvégeken egy még ennél is hosszabb regenerációs időszak követ.

A szakaszos, illetve folyamatos expozíció közötti választás a vizsgálat céljától és a szimulálni kívánt emberi helyzettől függ. Mindazonáltal figyelembe kell venni bizonyos technikai nehézségeket. Ilyen például, hogy a folyamatos expozíció előnyeit csökkentheti az ehhez szükséges itatás és etetés nehézsége, valamint a bonyolultabb (ugyanakkor megbízhatóbb) aeroszol- és páraképző berendezések, illetve a megfigyelő technikák igénye.

Expozíciós kamrák

A kísérlethez olyan inhalációs berendezést kell használni, amely óránként legalább tizenkét alkalommal légcserét tesz lehetővé a dinamikus légmozgás fenntartása érdekében, azért, hogy megfelelő oxigéntartalmat és egyenletesen eloszlatott expozíciós atmoszférát lehessen biztosítani. A kontroll- és az expozíciós kamrák tervezésének, felépítésének azonosnak kell lennie, hogy a körülmények a vizsgált anyag belélegeztetését kivéve minden tekintetben összehasonlíthatók legyenek. A kamrában általában enyhe negatív nyomást kell fenntartani, hogy a vizsgált anyag ne szivároghasson ki a környezetbe. Ha kamrát használunk, annak kialakítása révén a lehető legkisebbre kell csökkenteni a kísérleti állatok zsúfoltságát. Általános szabályként a kamra atmoszférája stabilitásának biztosítása érdekében a kísérleti állatok teljes térfogata nem haladhatja meg a vizsgálati kamra térfogatának 5 %-át.

A következő méréseket és ellenőrzéseket kell elvégezni:

i. Légáramlás: a légkamrán keresztül áramló levegő sebességét lehetőség szerint folyamatosan kell mérni;

ii. Koncentráció: a napi expozíciós időszak alatt a vizsgált anyag koncentrációjának változása nem haladhatja meg a középérték ± 15 %-át;

iii. Hőmérséklet és páratartalom: rágcsálóknál a vizsgálatokat 22 ± 2 °C kamrai hőmérsékleten és 30–70 % közötti relatív páratartalom mellett kell végezni, kivéve, amikor a vizsgált anyagot víz segítségével oszlatjuk el a kamra légterében. Lehetőleg mindkét értéket folyamatosan figyelemmel kell kísérni;

iv. A részecske nagyságának mérése: a folyékony és szilárd aeroszolt alkalmazó légkamrák légterében meg kell határozni a részecskék megoszlását. Az aeroszolrészecskéknek a felhasznált állatok számára belélegezhető nagyságúaknak kell lenniük. A légkamra mintáit az állatok légzési zónájából kell venni. A légminta legyen az állattal belélegeztetett részecske megoszlására nézve reprezentatív, és gravimetrikusan az összes szuszpendált aeroszolt képviselje még akkor is, ha azok nagy része nem lélegezhető be az állat számára. A részecske méretének meghatározását a kísérleti rendszer kialakítása során gyakran el kell végezni az aeroszol stabilitásának ellenőrzésére, azután pedig olyan gyakran, amilyen mértékben szükséges a belélegeztetés során, hogy megfelelően meghatározhassuk az állatok expozíciójára alkalmazott részecskemegoszlás állandóságát.

A vizsgálat időtartama

A rákkeltő hatás vizsgálatának időtartama a vizsgálati állatok normális élettartamának jelentős részére kiterjed. A vizsgálatokat egérnél és hörcsögnél 18 hónap, patkánynál 24 hónap elteltével kell befejezni; egyes, hosszabb életű és alacsonyabb spontán tumorképzésű fajtaváltozatoknál azonban egérnél és hörcsögnél a vizsgálatot 24 hónap, patkánynál pedig 30 hónap elteltével kell befejezni. A másik megoldás az ilyen hosszú távú vizsgálatnál, ha akkor hagyják abba, amikor a túlélő egyedek száma a legalacsonyabb adaggal kezelt vagy a kontrollcsoportban eléri a 25 %-ot. Ha olyan vizsgálatot fejeznek be, amelyben a válaszreakció nyilvánvaló nemtől függő különbsége észlelhető, mindkét nemet külön kell értékelni. Ha csakis kizárólag a nagy adaggal kezelt csoport állatai hullanak el idő előtt, nyilvánvalóan a toxicitásból kifolyólag, ez még nem ok a vizsgálat befejezésére, amennyiben a többi csoportnál a tünetek megjelenése nem jelent problémát. Negatív vizsgálati eredmény csak abban az esetben fogadható el, ha a szöveti autolízis, a kannibalizmus, illetve a tartási körülmények által okozott elhullás aránya egyik csoportban sem haladja meg a 10 %-ot, és valamennyi csoportban a túlélési arány meghaladja az 50 %-ot egérnél és hörcsögnél 18 hónap, patkánynál pedig 24 hónap elteltével.

A kísérlet végrehajtása

Megfigyelések

A ketrecben tartott állatok megfigyelésekor a bőr- és szőrelváltozásokra, a szemek és a nyálkahártyák változásaira, valamint a légzési, a keringési rendszerre, az autonóm és a központi idegrendszer működésére, a szomatomotoros tevékenységekre, valamint a viselkedési mintákra kell figyelemmel lenni.

Az állatok rendszeres megfigyelésére azért van szükség, hogy megelőzzük a kísérleti állatok kannibalizmus, szöveti autolízis, illetve rossz elhelyezés következtében történő elhullását. A vizsgálati időszak végeztével a kísérő csoportban lévő állatok kivételével minden túlélő állatot fel kell boncolni. A haldokló állatokat eltávolításuk után el kell pusztítani, és fel kell boncolni.

A klinikai tüneteket és az elhalálozásokat minden állatnál fel kell jegyezni. Külön figyelmet kell fordítani a daganatképződésre: minden szemmel látható vagy kitapintható daganat megjelenésének idejét, helyét, méreteit, megjelenési formáját és növekedését (progresszió) fel kell jegyezni.

A táplálékfogyasztást (és a vízfogyasztást, ha a vizsgált anyagot vízzel adjuk be) a vizsgálat első 13 hetében hetente kell mérni, majd megközelítőleg háromhavonta, hacsak az állatok egészségi állapota vagy testsúlyváltozása másként nem indokolja.

Az állatok testsúlyát az első 13 hét során egyedileg, hetente kell mérni, ezután legalább négyhetente egyszer.

Klinikai vizsgálatok

Hematológiai vizsgálat

Ha a megfigyelések az állatok egészségének romlására utalnak a vizsgálat során, az érintett állatok kvantitatív vérképvizsgálatát is el kell végezni.

A 12. hónapban, a 18. hónapban és az elpusztítás előtt vérkenetet kell készíteni az állatokból. A kvantitatív vérképvizsgálatot a legnagyobb adaggal kezelt állatoknál és a kontrollcsoport állatainál kell elvégezni. Ha az említett vizsgálatok adatai, különösen az elpusztítás előtt vett mintákból származó eredmények, illetve a kórbonctani eredmények ezt indokolják, a második legnagyobb adaggal kezelt csoport(ok)nál is el kell végezni a kvantitatív vérképvizsgálatot.

Autopszia

Minden állaton teljes körű makroszkópos boncolást kell végezni, beleértve azokat is, amelyek a vizsgálat során hullottak el, illetve amelyeket haldokló állapotban találtak, és ezért elpusztítottak. Valamennyi, szabad szemmel látható elváltozást, daganatot, illetve daganatgyanús elváltozást meg kell őrizni.

Az alábbi szerveket kell megfelelő közegben tartósan tárolni egy esetleges későbbi kórszövettani vizsgálat céljaira: valamennyi feltűnő elváltozás, agy (beleértve a nyúltagy/híd, a kisagykéreg, a nagyagykéreg metszeteit), az agyalapi mirigy, pajzsmirigy/mellékpajzsmirigy, bármilyen csecsemőmirigy-szövet, a légcső és a tüdő, a szív, az aorta, a nyálmirigyek, a máj, a lép, a vesék, a mellékvesék, a hasnyálmirigy, az ivarmirigyek, a méh, a járulékos nemi szervek, a bőr, a nyelőcső, a gyomor, a patkóbél, az éhbél, a csípőbél, a vakbél, a vastagbél, a végbél, a húgyhólyag, a reprezentatív nyirokcsomók, a női emlőmirigy, a combizomzat, a perifériás idegek, a szegycsont a csontvelővel, a combcsont (az ízületi felülettel együtt), a gerincoszlop három szinten (nyaki, mellkasközéptáji és ágyéki csigolyáknál), valamint a szemek.

A tüdő és a húgyhólyag megőrzésére a legjobb módszer a fixálóval való feltöltés. A tüdő folyadékkal való feltöltése az inhalációs vizsgálatoknál a megfelelő kórszövettani vizsgálat előfeltétele. Inhalációs vizsgálatoknál a teljes légzőrendszert vizsgálni kell, az orral, a garattal és a gégefővel együtt.

Kórszövettani vizsgálatok

a) Teljes kórszövettani vizsgálatot kell végezni a vizsgálat során elhullott vagy elpusztított valamennyi állat, a nagy adaggal kezelt csoport és a kontrollcsoport állatainak szervein és szövetein.

b) Valamennyi csoportban minden, szabad szemmel látható daganatot, illetve daganatgyanús elváltozást meg kell vizsgálni mikroszkóppal is.

c) Ha jelentős különbség mutatkozik a nagy adaggal kezelt csoport és a kontrollcsoport daganatos elváltozásainak előfordulási gyakoriságában, az adott szövet vagy szerv kórszövettani vizsgálatát a többi csoportban is el kell végezni.

d) Ha a legnagyobb adaggal kezelt csoport túlélési adatai jelentősen rosszabbak a kontrollcsoporténál, az eggyel alacsonyabb adaggal kezelt csoportban is teljes körű vizsgálatot kell végezni.

e) Ha a legnagyobb adaggal kezelt csoportban a daganatos elváltozás lefolyását esetleg befolyásoló toxikus vagy más hatások jelenléte tapasztalható, az eggyel alacsonyabb adaggal kezelt csoportban is teljes körű vizsgálatot kell végezni.

2. ADATOK

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, amely minden vizsgálati csoportban megadja az állatok számát a vizsgálat kezdetén, azon állatok számát, amelyeknél a kísérlet folyamán tumort diagnosztizáltak, azon állatok számát, amelyeknél a boncolás folyamán tumort diagnosztizáltak, illetve ennek időpontját. Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni. Bármely elfogadott statisztikai módszer használható.

3. ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– használt faj, törzs, az állatok származása, tartási körülmények, étrend,

– vizsgálati körülmények:

Az expozíciós készülék leírása:

beleértve a készülék konstrukcióját, típusát, méreteit, a levegő forrását, a részecskék és aeroszolok előállítására szolgáló rendszert, a klímarendszert, az elhasznált levegő kezelésének módját, az állatoknak a vizsgálati kamrában való elhelyezését. A hőmérsékletet, a levegő páratartalmát és adott esetben az aeroszolkoncentráció stabilitását, illetve a részecskenagyságot le kell írni.

Expozíciós adatok:

ezeket táblázatos formában kell közölni, az átalagértékek és az azoktól való eltérés megjelölésével. A következő adatokat kell tartalmazniuk:

a) légáram sebessége az inhalációs készülékben;

b) hőmérséklet és a levegő páratartalma;

c) névleges koncentráció (az inhalációs készülékbe helyezett vizsgált anyag összmennyisége osztva a levegő térfogatával);

d) vivőanyag jellege (ha van);

e) tényleges koncentráció a belégzési zónában;

f) átlagos részecskenagyság (amennyiben szükséges),

– adagolás (beleértve a vivőanyagot is, ha van) és koncentrációk

– a daganatok előfordulási gyakorisága nemenként, dózisonként és a daganat típusa szerint,

– az elpusztulás ideje a vizsgálat során, illetve, hogy az állatok megélték-e a vizsgálat végét,

– a toxikus reakciók nemenként és dózisonként,

– a toxikus és más hatások leírása,

– az egyes mérgezési tünetek megfigyelésének időpontja és a megfigyelést követő változásuk,

– a takarmány fogyasztásával és a testsúly változásával kapcsolatos adatok,

– az elvégzett hematológiai vizsgálatok és azok valamennyi eredménye,

– boncolási leletek,

– a kórszövettani vizsgálatok eredményének részletes ismertetése,

– az eredmények statisztikai feldolgozása, ahol lehetséges,

– az eredmények megvitatása,

– az eredmények értelmezése.

3.2. **Értékelés és értelmezés**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

A KRÓNIKUS TOXICITÁS ÉS A RÁKKELTŐ HATÁS EGYÜTTES VIZSGÁLATA

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. Referenciaanyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A krónikus toxicitás és a rákkeltő hatás együttes vizsgálatának célja valamely anyag hosszan tartó expozíció hatására kialakuló krónikus, illetve rákkeltő hatásainak meghatározása valamely emlősfajon.

Ennek érdekében a rákkeltő hatásnál ismertetett vizsgálatot legalább egy kísérő csoporttal és egy kísérő kontrollcsoporttal kell kibővíteni. A nagy adaggal kezelt kiegészítő csoportban az adag nagysága nagyobb lehet, mint a rákkeltő hatásra irányuló vizsgálatban a nagy adaggal kezelt csoporté. A rákkeltő hatásra irányuló vizsgálatban az állatokon az általános toxicitás és a rákkeltő hatás jeleit egyaránt keresni kell. A kezelt kísérő csoportban azonban az állatokat csak a toxicitás szempontjából vizsgáljuk meg.

A vizsgált anyagot rendszerint heti hét alkalommal, a megfelelő módon, fokozatos adagokban adjuk be a kísérleti állatcsoportoknak, élettartamuk jelentős részén keresztül. Az adagolási időszak alatt és után az állatokat a mérgező hatás jelei, különösen a daganatképződés észlelése érdekében naponta kell megvizsgálni.

1.5. Minőségi követelmények

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

Az állatokat a vizsgálat előtt legalább öt napon keresztül a vizsgálat tartási és takarmányozási körülményei között kell tartani. Az egészséges, fiatal állatokat a vizsgálat megkezdése előtt véletlenszerű kiválasztással kezelt és kontrollcsoportokba kell beosztani.

A kísérlethez felhasznált állatok

A javasolt állatfaj a patkány. Korábban végzett vizsgálatok eredményeire alapozva egyéb, rágcsáló vagy nem rágcsáló fajokat is lehet használni. Kísérleti célokra tenyésztett laboratóriumi állattörzsekből származó egészséges és fiatal állatokat használjunk, az adagolást pedig a szoptatás utáni elválasztást követően minél előbb meg kell kezdeni.

A vizsgálat kezdetén az állatok súlya lehetőleg csak minimálisan térjen el egymástól, az átlagos értéktől legfeljebb ± 20 %-kal különbözhet. Ha a szubkrónikus orális vizsgálatot valamely hosszú távú vizsgálat előzményeként végezzük el, mindkét vizsgálathoz ugyanazon fajt, illetve kísérleti állattörzset kell felhasználni.

Az állatok száma és neme

Rágcsálók esetében minden adagolási szintnél, valamint a hozzájuk tartozó kontrollcsoportnál legalább 100 állatot kell felhasználni (50 hímet és 50 nőstényt). A nőstényeknél követelmény, hogy nem lehetnek leellettek vagy vemhesek. Ha időközi elpusztítást tervezünk, akkor a létszámot annyival kell megnövelni, ahány állatot a vizsgálat befejezése előtt el akarunk pusztítani.

A nem daganatos patológiás tünetek értékelésére szánt, kezelt kísérő csoport(ok)nak legalább 20 állatot kell tartalmaznia/tartalmazniuk nemenként, a kísérő kontrollcsoportnál pedig ez a szám 10 állat nemenként.

Adagolási szintek (dózisok) és expozíciós gyakoriság

A rákkeltő hatás vizsgálatához legalább három adagolási szintet (dózist) és egy kontrollt kell használni. A legnagyobb adaggal kezelt csoportban jelentkeznie kell a toxikus hatásnak, például a súlynövekedés kismértékű (10 %-ot nem meghaladó) visszaesése formájában, anélkül hogy a daganatos elváltozásokon kívül egyéb módon lényegesen megváltoztatná az életkilátásokat.

A legalacsonyabb adaggal kezelt csoportban a vizsgált anyag nem lehet hatással az állatok növekedésére, fejlődésére, illetve élettartamára, és nem okozhat toxikus tüneteket. E dózis általában nem lehet a legnagyobb dózis 10 %-ánál alacsonyabb.

A közbeeső csoportok adagjainak nagyságát a legkisebb és legnagyobb adag között pontosan középen kell kijelölni.

Az adagolási szinteket a korábbi toxicitásvizsgálatokat figyelembe véve kell megválasztani.

A krónikus toxicitás meghatározására további kezelt és kontroll-kísérőcsoportokat kell alkalmazni. A kísérő csoportot olyan adaggal kell kezelni, hogy az abban lévő állatok az egyértelmű toxicitás jeleit mutassák.

Az expozíciót rendszerint naponta kell megismételni. Ha a vegyületet ivóvízzel vagy takarmányba keverve adjuk be, akkor azoknak folyamatosan az állatok rendelkezésére kell állnia.

Kontrollcsoportok

A kezelt csoporttal a vizsgált anyaggal való expozíció kivételével minden egyéb tekintetben azonos kontrollcsoportot kell használni.

Különleges körülmények között, például aeroszolokat is alkalmazó belégzési vizsgálatban vagy nem jellemzett biológiai aktivitással rendelkező emulzióképző anyag szájon át történő adagolásakor egy további, kezeletlen kontrollcsoportra is szükség van, amelynek állatai nem kerülnek kapcsolatba a vivőanyaggal.

Az adagolás módja

Az adagolás három fő úton történhet: szájon át, bőrön át, illetve belélegeztetéssel. Az adagolás módjának megválasztása függ a vizsgált anyag fizikai és kémiai tulajdonságaitól, valamint az emberi expozíció valószínű módjától.

Vizsgálatok orális adagolással

Ha a vizsgált anyag felszívódik a gyomor-bél rendszerből, és ha a táplálékfelvétel az esetleges emberi expozíció egyik módja, akkor az orális adagolás a választandó módszer, hacsak ellenjavallata nincs. Az állatok a vizsgált anyagot a takarmánnyal, az ivóvízben oldva, illetve kapszulában kaphatják. Ideális esetben az anyagot naponta kell adagolni a hét mind a hét napján, miután az ötnapos rendszerű adagolás gyógyulással vagy a toxikus tünetek megszűnésével járhat a kimaradó időszakban, és így befolyásolhatja az eredményeket és azok értékelését. Ám főként gyakorlati megfontolások alapján az ötnapos adagolási hét is elfogadhatónak tekintendő.

Vizsgálatok dermális expozícióval

A bőr ecsetelésével végzett expozíció olyan esetben választható, ha az az emberi expozíció fő módját szimulálja, illetve, ha bőrelváltozásokra akarnak modellrendszert felállítani.

Vizsgálatok inhalációs adagolással

Miután az inhalációs vizsgálatok sokkal összetettebb technikai problémákat jelentenek, mint az adagolás más módjai, az adagoláshoz itt sokkal részletesebb útmutatást kell adni. Szükséges megjegyezni, hogy bizonyos körülmények között a közvetlen légcsőbe juttatás (instilláció) is érvényes módszer lehet.

A hosszú távú expozíció alapja rendszerint az emberi expozíció modellezése, ami két lehetőséget jelent. Az egyik lehetőségnek megfelelően a kamra-koncentráció kiegyenlítődését követően naponta hat órán keresztül kell belélegeztetni az állatokkal a vizsgált anyagot heti öt napon keresztül (szakaszos expozíció), a másik lehetőség pedig a környezeti expozíciónak jobban megfelelő módszer, azaz napi 22–24 órán át, a hét minden napján végzett belélegeztetés (folyamatos expozíció), amelybe körülbelül egyórás napi megszakítás is beletartozik, mindennap ugyanazon időben, amikor is az állatok megkapják a takarmányt, és amikor a kamrát karbantartjuk. Az állatok általában mindkét esetben állandó koncentrációnak vannak kitéve. A szakaszos és a folyamatos expozíció közötti alapvető különbség az, hogy az előbbiben van egy 17–18 órás időszak, amikor az állatok regenerálódhatnak a napi adag hatását követően, amelyet a hétvégeken egy még ennél is hosszabb regenerációs időszak követ.

A szakaszos, illetve folyamatos expozíció közötti választás a vizsgálat céljától és a szimulálni kívánt emberi helyzettől függ. Mindazonáltal figyelembe kell venni bizonyos technikai nehézségeket. Ilyen például, hogy a folyamatos expozíció előnyeit csökkentheti az ehhez szükséges itatás és etetés nehézsége, valamint a bonyolultabb (ugyanakkor megbízhatóbb) aeroszol- és páraképző berendezések, illetve a megfigyelő technikák igénye.

Expozíciós kamrák

A kísérlethez olyan inhalációs berendezést kell használni, amely óránként legalább tizenkét alkalommal légcserét tesz lehetővé a dinamikus légmozgás fenntartása érdekében, azért, hogy megfelelő oxigéntartalmat és egyenletesen eloszlatott expozíciós atmoszférát lehessen biztosítani. A kontroll- és az expozíciós kamrák tervezésének, felépítésének azonosnak kell lennie, hogy a körülmények a vizsgált anyag belélegeztetését kivéve minden tekintetben összehasonlíthatók legyenek. A kamrában általában enyhe negatív nyomást kell fenntartani, hogy a vizsgált anyag ne szivároghasson ki a környezetbe. Ha kamrát használnak, annak kialakítása révén a lehető legkisebbre kell csökkenteni a vizsgálati állatok zsúfoltságát. Általános szabályként a kamrai atmoszféra stabilitásának biztosítása érdekében a vizsgálati állatok teljes térfogata nem haladhatja meg a vizsgálati kamra térfogatának 5 %-át.

A következő méréseket és ellenőrzéseket kell elvégezni:

i. Légáramlás: a légkamrán keresztül áramló levegő sebességét lehetőség szerint folyamatosan kell mérni;

ii. Koncentráció: a napi expozíciós időszak alatt a vizsgált anyag koncentrációjának változása nem haladhatja meg a középérték ± 15 %-át;

iii. Hőmérséklet és páratartalom: rágcsálóknál a vizsgálatokat 22 ± 2 °C kamrai hőmérsékleten és 30–70 % közötti relatív páratartalom mellett kell végezni, kivéve, amikor a vizsgált anyagot víz segítségével oszlatjuk el a kamra légterében. Lehetőleg mindkét értéket folyamatosan figyelemmel kell kísérni;

iv. A részecske nagyságának mérése: a folyékony és szilárd aeroszolt alkalmazó légkamrák légterében meg kell határozni a részecskék megoszlását. Az aeroszolrészecskéknek a felhasznált állatok számára belélegezhető nagyságúaknak kell lenniük. A légkamra mintáit az állatok légzési zónájából kell venni. A légminta legyen az állattal belélegeztetett részecskemegoszlására nézve reprezentatív, és gravimetrikusan az összes szuszpendált aeroszolt képviselje még akkor is, ha azok nagy része nem lélegezhető be az állat számára. A részecskeméret meghatározását a kísérleti rendszer kialakítása során gyakran el kell végezni az aeroszol stabilitásának ellenőrzésére, azután pedig olyan gyakran, ahogy szükséges a belélegeztetés során, hogy megfelelően meghatározhassák az állatok expozíciójára alkalmazott részecskemegoszlás állandóságát.

A vizsgálat időtartama

A rákkeltő hatás vizsgálatának időtartama a kísérleti állatok normális élettartamának jelentős részére kiterjed. A vizsgálatokat egérnél és hörcsögnél 18 hónap, patkánynál 24 hónap elteltével kell befejezni; egyes, hosszabb életű és alacsonyabb spontán tumorképzésű fajtaváltozatoknál azonban egérnél és hörcsögnél a vizsgálatot 24 hónap, patkánynál pedig 30 hónap elteltével kell befejezni. A másik megoldás az ilyen hosszú távú vizsgálatnál, ha akkor hagyják abba, amikor a túlélő egyedek száma a legalacsonyabb adaggal kezelt vagy a kontrollcsoportban eléri a 25 %-ot. Ha olyan vizsgálatot fejeznek be, amelyben a válaszreakció nyilvánvaló nemtől függő különbsége észlelhető, mindkét nemet külön kell értékelni. Ha csak a nagy adaggal kezelt csoport állatai hullanak el idő előtt, nyilvánvalóan a toxicitásból kifolyólag, ez még nem ok a vizsgálat befejezésére, amennyiben a többi csoportban a tünetek megjelenése nem jelent problémát. Negatív vizsgálati eredmény csak abban az esetben fogadható el, ha a szöveti autolízis, a kannibalizmus, illetve a tartási körülmények által okozott elhullás aránya egyik csoportban sem haladja meg a 10 %-ot, és valamennyi csoportban a túlélési arány meghaladja az 50 %-ot egérnél és hörcsögnél 18 hónap, patkánynál pedig 24 hónap elteltével.

A vizsgálatban részt vevő és a krónikus toxicitás mérésére használt, nemenként 20 állatot tartalmazó kezelt és a hozzájuk tartozó, nemenként 10 állatot tartalmazó kontrollcsoportokat a vizsgálat befejezése után még legalább 12 hónapig kell megfigyelés alatt tartani. Ezen állatokat ütemterv szerint el kell pusztítani annak vizsgálata érdekében, hogy a vizsgált anyag milyen mértékben okoz az öregkori elváltozásoktól független kóros hatásokat.

A kísérlet végrehajtása

Megfigyelések

A ketrecben tartott állatok megfigyelésekor a bőr- és szőrelváltozásokra, a szemek és a nyálkahártyák változásaira, valamint a légzési, a keringési rendszerre, az autonóm és a központi idegrendszer működésére, a szomatomotoros tevékenységekre, valamint a viselkedési mintákra kell figyelemmel lenni.

A kezelt kísérő csoport(ok) állatain megfelelő időközönként klinikai vizsgálatokat kell végezni.

Az állatok rendszeres megfigyelésére azért van szükség, hogy megelőzzék a kísérleti állatok kannibalizmus, szöveti autolízis, illetve rossz elhelyezés következtében történő elhullását. A vizsgálati időszak végeztével a kísérő csoportban lévő állatok kivételével minden túlélő állatot el kell pusztítani, és fel kell boncolni. A haldokló állatokat az eltávolításukat követően el kell pusztítani, és fel kell boncolni.

A klinikai tüneteket és az elhalálozásokat minden állatnál fel kell jegyezni. Külön figyelmet kell fordítani a daganatképződésre: minden, szemmel látható vagy kitapintható daganat megjelenésének idejét, helyét, méreteit, megjelenési formáját és növekedését (progresszió) fel kell jegyezni.

A táplálékfogyasztást (és a vízfogyasztást, ha a vizsgált anyagot vízzel adjuk be) a vizsgálat első 13 hetében hetente kell mérni, majd megközelítőleg háromhavonta, hacsak az állatok egészségi állapota vagy testsúlyváltozása másként nem indokolja.

Az állatok testsúlyát az első 13 hét során egyedileg, hetente kell mérni, ezután legalább négyhetente egyszer.

Klinikai vizsgálatok

Hematológiai vizsgálat

A harmadik hónapban, a hatodik hónapban és ezután megközelítőleg félévente, valamint a vizsgálat végén csoportonként/nemenként 10 patkánynál valamennyi vizsgálati csoportnál a levett vérmintákból hematológiai vizsgálatot (például hemoglobin-tartalom, hematokritérték, vörösvérsejtszám, teljes fehérvérsejtszám, trombocitaszám, illetve egyéb alvadási paraméterek) kell végezni. Ha lehetséges, minden mintát minden alkalommal ugyanattól a patkánytól kell venni.

Ha a klinikai megfigyelések az állatok egészségének romlására utalnak a vizsgálat során, az érintett állatoknál kvantitatív vérképvizsgálatot is kell végezni.

Szintén kvantitatív vérképvizsgálatot kell végezni a legnagyobb adaggal kezelt állatoknál és a kontrollcsoportban. A második legnagyobb adaggal kezelt csoportnál e vizsgálatot csak akkor kell elvégezni, ha jelentős különbség van a kontroll- és a legnagyobb adaggal kezelt csoport között, illetve, ha a kórbonctani eredmények ezt indokolják.

Vizeletvizsgálat

Csoportonként/nemenként 10 patkánynál valamennyi vizsgálati csoportnál a vérvizsgálattal egy időben vizeletmintát is kell venni a vizeletvizsgálathoz. Egyedileg vagy nemenként/csoportonként összesített mintákból az alábbi meghatározásokat kell elvégezni:

– külső megjelenés: térfogat és sűrűség, állatonként,

– fehérje, glükóz, keton, vér (szemikvantitatív meghatározás),

– az üledék mikroszkópos vizsgálata (szemikvantitatív meghatározás).

Klinikai kémia

Valamennyi nem rágcsáló állatnál és csoportonként/nemenként 10 patkánynál valamennyi vizsgálati csoportnál, lehetőség szerint minden alkalommal ugyanazon patkányoktól, megközelítőleg hathavonta, illetve a vizsgálati időszak végeztével vérmintákat kell venni klinikai kémiai vizsgálatok céljaira. Ezenkívül a nem rágcsálóktól vizsgálat előtti mintát is kell venni. A mintákból plazmát kell készíteni, és az alábbi meghatározásokat kell elvégezni:

– össz-fehérjekoncentráció,

– albuminkoncentráció,

– májfunkciós vizsgálatok (például alkalikusfoszfatáz-aktivitás, szérum glutaminsav szőlősav transzaminász- [GPT] ([1]), szérum glutaminsav oxálsav transzaminász [GOT] ([2]) aktivitás) gamma glutamil-transzpeptidáz, ornitin dekarboxiláz,

– szénhidrát-anyagcsere, például éhgyomorra mért vércukorszint,

– vesefunkciós vizsgálatok, például karbamid a vérben.

([1]) Ma szérum alanin aminotranszferáz néven ismert.
([2]) Ma szérum aszparaginsav aminotranszferáz néven ismert.

Autopszia

Minden állaton teljes körű makroszkópos boncolást kell végezni, beleértve azokat is, amelyek a vizsgálat során hullottak el, illetve amelyeket haldokló állapotban találtunk, és ezért elpusztítottunk. A leölés előtt az állatoktól kvantitatív vérképvizsgálat céljából vérmintát kell venni. Valamennyi, szabad szemmel látható elváltozást, daganatot, illetve daganatgyanús elváltozást meg kell őrizni. Meg kell kísérelni a makroszkópos és mikroszkópos elváltozások közötti összefüggések feltárását.

Az összes szervet és szövetet fixálni kell egy esetleges későbbi kórszövettani vizsgálat céljaira. Ez rendszerint a következő szövetekre és szervekre vonatkozik: agy [1] (a nyúltagy/híd, a kisagykéreg, a nagyagykéreg), az agyalapi mirigy, a pajzsmirigy (a mellékpajzsmiriggyel együtt), a csecsemőmirigy, a tüdő (a légcsővel együtt), a szív, az aorta, a nyálmirigyek, a máj [1], a lép, a vesék [1], a mellékvesék [1], a nyelőcső, a gyomor, a patkóbél, az éhbél, a csípőbél, a vakbél, a vastagbél, a végbél, a méh, a húgyhólyag, a nyirokcsomók, a hasnyálmirigy, az ivarmirigyek [1], a járulékos nemi szervek, a női emlőmirigy, a bőr, az izomzat, a perifériás idegek, a gerincvelő (nyaki, háti, ágyéki), a szegycsont a csontvelővel és a combcsont (az ízületi felülettel együtt), valamint a szemek.

A tüdő és a húgyhólyag megőrzésére a legjobb módszer a fixálóval való feltöltés. A tüdő folyadékkal való feltöltése az inhalációs vizsgálatoknál a megfelelő kórszövettani vizsgálat előfeltétele. Különleges, például inhalációs vizsgálatoknál a teljes légzőrendszert vizsgálni kell, az orral, a garattal és a gégefővel együtt.

Ha más klinikai vizsgálatokat is végzünk, az azokból nyert információknak a mikroszkópos vizsgálatokat megelőzően kell rendelkezésre állniuk, mert a patológus számára lényegi információkkal szolgálhatnak.

Kórszövettani vizsgálatok

A vizsgálat krónikus toxicitásra irányuló részében:

a nagy adaggal kezelt kísérő csoport, valamint a kontrollcsoport minden tagjának valamennyi eltett szervét részletesen meg kell vizsgálni. Ha a vizsgált anyaggal kapcsolatos patológiás elváltozást találunk a nagy adaggal kezelt kísérő csoportban, az összes többi kezelt kísérő csoport valamennyi állatának célszerveit, valamint a vizsgálat rákkeltő hatásra irányuló részébe tartozó kezelt csoportok állatait a vizsgálati időszak végeztével szintén hasonlóan teljes és részletes vizsgálatnak kell alávetni.

A vizsgálat rákkeltő hatásra irányuló részében:

a) Teljes kórszövettani vizsgálatot kell végezni a vizsgálat során elhullott vagy elpusztított valamennyi állat, a nagy adaggal kezelt csoport és a kontrollcsoport állatainak szervein és szövetein;

b) Valamennyi csoportban minden, szabad szemmel látható daganatot, illetve daganatgyanús elváltozást meg kell vizsgálni minden csoportnál minden szerven;

c) Ha jelentős különbség mutatkozik a nagy adaggal kezelt csoport és a kontrollcsoport daganatos elváltozásainak előfordulási gyakoriságában, az adott szövet vagy szerv kórszövettani vizsgálatát a többi csoportban is el kell végezni;

d) Ha a legnagyobb adaggal kezelt csoport túlélési adatai jelentősen rosszabbak a kontrollcsoporténál, az eggyel alacsonyabb adaggal kezelt csoportban is teljes körű vizsgálatot kell végezni;

e) Ha a legnagyobb adaggal kezelt csoportban a daganatos elváltozás lefolyását esetleg befolyásoló toxikus vagy más hatások jelenléte tapasztalható, az eggyel alacsonyabb adaggal kezelt csoportban is teljes körű vizsgálatot kell végezni.

2. ADATOK

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, amely minden vizsgálati csoportban megadja az állatok számát a vizsgálat kezdetén, azon állatok számát, amelyeknél a kísérlet folyamán tumort diagnosztizáltak, vagy toxicitási jeleket észleltek, azon állatok számát, amelyeknél a boncolás folyamán tumort diagnosztizáltak, illetve ennek időpontját. Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni. Bármely elfogadott statisztikai módszer használható.

3. ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– használt faj, törzs, az állatok származása, tartási körülmények, étrend,

[1] E szervek súlyát rágcsálók esetében nemenként és csoportonként tíz állatnál mérni kell.

– vizsgálati körülmények:

Az expozíciós készülék leírása:

beleértve a készülék konstrukcióját, típusát, méreteit, a levegő forrását, a részecskék és aeroszolok előállítására szolgáló rendszert, a klímarendszert, az elhasznált levegő kezelésének módját, az állatoknak a vizsgálati kamrában való elhelyezését. A hőmérsékletet, a levegő páratartalmát és adott esetben az aeroszolkoncentráció stabilitását, illetve a részecskenagyságot le kell írni.

Expozíciós adatok:

ezeket táblázatos formában kell közölni, az átalagértékek és az azoktól való eltérés megjelölésével. A következő adatokat kell tartalmazniuk:

a) légáram sebessége az inhalációs készülékben;

b) hőmérséklet és a levegő páratartalma;

c) névleges koncentráció (az inhalációs készülékbe helyezett vizsgált anyag összmennyisége osztva a levegő térfogatával);

d) vivőanyag jellege (ha van);

e) tényleges koncentráció a belégzési zónában;

f) átlagos részecskenagyság (amennyiben szükséges),

– adagolás (beleértve a vivőanyagot is, ha van) és koncentrációk,

– a daganatok előfordulási gyakorisága nemenként, dózisonként és a daganat típusa szerint,

– az elpusztulás ideje a vizsgálat során, illetve, hogy az állatok megélték-e a vizsgálat végét,

– a toxikus reakciók nemenként és dózisonként,

– a toxikus és más hatások leírása,

– az egyes mérgezési tünetek megfigyelésének időpontja és a megfigyelést követő változásuk,

– szemészeti leletek

– a takarmány fogyasztásával és a testsúly változásával kapcsolatos adatok,

– az elvégzett hematológiai vizsgálatok és azok valamennyi eredménye,

– klinikai kémiai vizsgálatok és azok eredményei (beleértve a vizeletvizsgálatot is),

– boncolási leletek,

– a kórszövettani vizsgálatok eredményének részletes ismertetése,

– az eredmények statisztikai feldolgozása, ahol lehetséges,

– az eredmények megvitatása,

– az eredmények értelmezése.

3.2. **Értékelés és értelmezés**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

EGYGENERÁCIÓS REPRODUKCIÓS TOXICITÁSVIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. Referenciaanyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A vizsgált anyagot naponta szájon át, fokozatosan növekvő adagokban adjuk be több kísérleti állatcsoportnak, hímeknek és nőstényeknek. A hímeknek a növekedés ideje alatt és legalább egy teljes csírasejtképzési cikluson keresztül (egérben megközelítőleg 56 nap, patkányban 70 nap) kell adni a vizsgált anyagot, hogy annak a csírasejtképzésre gyakorolt esetleges kedvezőtlen hatása kifejlődhessen.

A szülői (P) nemzedék nőstényeinek legalább két teljes párzási időszakon keresztül kell adagolni a vizsgált anyagot, hogy annak az ivarzási ciklusra gyakorolt esetleges kedvezőtlen hatása kifejlődhessen. Ezután a kísérleti állatokat pároztatják. A vizsgált anyagot a párzási időszak alatt mindkét nemnek adagolni kell, azt követően csak a nőstényeknek a vemhesség ideje alatt, valamint a szoptatás időszakában.

Az anyag inhalációs adagolásához a módszer módosítást igényel.

1.5. Minőségi követelmények

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

Előkészületek

Az egészséges, fiatal állatokat a vizsgálat megkezdése előtt véletlenszerű kiválasztással kezelt és kontrollcsoportokba kell beosztani. Az állatokat a vizsgálat előtt legalább öt napon keresztül a vizsgálat tartási és takarmányozási körülményei között kell tartani.

A vizsgált anyag ajánlott adagolási módja: a takarmánnyal vagy az ivóvízzel. Más alkalmazási módok is elfogadhatók. A vizsgált anyagokat valamennyi állatnak azonos módszerrel kell adagolni a vizsgálat teljes időtartama alatt. Ha az adagolás megkönnyítésére vivőanyagot vagy más adalékanyagot használnak, meg kell bizonyosodni arról, hogy azok nem rendelkeznek toxikus hatással.

Az adagolást heti hét napon kell végezni.

A kísérlethez felhasznált állatok

A faj kiválasztása

A javasolt faj a patkány vagy az egér. Korábban vizsgálatban még részt nem vett, egészséges állatokat kell használni. Ne használjunk rossz termékenységű törzseket. Az állatokat faj, törzs, nem, súly és/vagy kor szerint kell jellemezni.

A termékenység megállapítása érdekében mind a hím, mind a nőstény állatokat meg kell vizsgálni. Mind a kontroll-, mind a kísérleti csoportban csak az elválasztást követően lehet megkezdeni a vizsgált anyag adagolását.

Az állatok száma és neme

Minden adagolási és kontrollcsoportnak elegendő állatot kell tartalmaznia ahhoz, hogy legalább 20 vemhes, illetve az elléshez közel álló nőstény legyen benne.

A cél az, hogy megfelelő mennyiségű vemhességet és utódot hozzanak létre ahhoz, hogy felmérhessük az anyag hatását a termékenységre, a vemhességre és az anyai viselkedésre a szülői (P) nemzedékben, valamint a szopásra, a növekedésre és a fejlődésre az F_1 utódnemzedékben a fogamzástól a szoptatástól való elválasztásig.

Vizsgálati körülmények

Annyi élelmet és vizet kell adni, amennyire csak szükség van (*ad libitum*). Az ellés előtt a vemhes nőstényeket el kell különíteni, elletőketrecekbe kell rakni, és az alom kialakításához használt (fészeképítő) anyaggal is el lehet látni.

Adagolási szintek (dózisok)

Legalább három adagolási szintet (dózist) és egy kontrollt kell használni. Ha az anyag beadásához vivőanyagot alkalmaznak, akkor a kontrollcsoportnak a vivőanyagból a felhasznált legnagyobb mennyiséget kell kapnia. Ha a vizsgált anyag csökkent táplálékfelvételt, illetve táplálékhasznosítást vált ki, szükség lehet egy korlátozott etetéssel tartott kontrollcsoport beállítására. Ideális esetben, ha azt a vizsgált anyag biológiai, illetve fizikokémiai tulajdonságai lehetővé teszik, a legnagyobb adaggal kezelt csoport szülő állataiban (P) ugyan jelentkeznie kell a toxikus hatásnak, de elhullásnak nem. A közepes adaggal kezelt csoport(ok)ban a vizsgált anyagnak tulajdonítható toxikus hatás minimális jeleinek kell megjelenni, és az alacsony adaggal kezelt csoportban az anyag nem okozhat észrevehető kedvezőtlen hatást sem a szülőknél, sem az utódoknál. Ha az állatok gyomorszondával vagy kapszulában kapják az adagot, azt az adott állat testsúlyára számítva kell adni, és azt hetente a testsúly változásaihoz kell igazítani. A vemhesség alatt a nőstények adagja szükség esetén a vemhesség nulladik, illetve hatodik napján mért testsúlyra számítható ki.

Határérték-vizsgálat

Alacsony toxicitású anyagoknál, ha az 1 000 mg/testsúlykilogramm, illetve az azt meghaladó dózis nem okoz semmilyen zavart a szaporodási képességben, a többi adagolási szinten végzett vizsgálatok szükségtelennek tekinthetők. Ha a nagy dózissal kezelt csoportban az anyára gyakorolt toxikus hatást egyértelműen mutató előzetes vizsgálatban nem volt észlelhető kedvezőtlen hatás a termékenység vonatkozásában, akkor a többi adagolási szinten végzett vizsgálat szükségtelennek tekinthető.

A kísérlet végrehajtása

Vizsgálati ütemterv

A szülői (P) nemzedék hímjeinél a napi adagolást az állatok öt- és kilenchetes kora között kell megkezdeni, miután a szoptatott állatokat elválasztották, és legalább öt napon keresztül a vizsgálati körülmények mellett tartották. A patkányoknál az adagolást a párzási időszak előtt 10 héten át kell folytatni (egér esetében ez az idő nyolc hét). A hímeket vagy a párzási időszakot követően kell elpusztítani és megvizsgálni, vagy a vizsgálati étrend mellett kell azokat tovább tartani egy esetleges második alom létrehozásához, majd nem sokkal a vizsgálat vége előtt kell elpusztítani és megvizsgálni. A szülői nemzedék (P) nőstényeinél az ötnapos szoktatást követően kell megkezdeni a vizsgált anyag adagolását, és legalább a párzást két héttel megelőző időpontig kell folytatni. A P nőstényeknél a napi adagolást folytatni kell az egész, háromhetes párzási időszak során és a vemhesség alatt, amíg az F_1 utódnemzedéket el nem választjuk. Az adagolás ütemezése szükséges lehet akkor, ha más információ is rendelkezésre áll a vizsgált anyagról, például annak anyagcsere-fokozó hatásairól vagy biológiai felhalmozódásáról.

Pároztatás

A reprodukciós toxicitásvizsgálatokban vagy 1:1 (egy hím-egy nőstény) vagy 1:2 (egy hím-két nőstény) párosítást alkalmazhatunk.

Az 1:1 arányú pároztatás esetén egy nőstényt addig kell ugyanazon hímmel együtt tartani, míg teherbe nem esett, vagy három hét időtartamig. A nőstényt minden reggel megvizsgáljuk a sperma vagy a hüvelyi dugó jelenléte szempontjából. A vemhesség nulladik napjának azt a napot tekintjük, amikor a hüvelyi dugó vagy a sperma megtalálható.

A sikertelen párokat megvizsgálják annak megállapítása érdekében, hogy mi az oka a terméketlenségnek. Ez adott esetben azt jelentheti, hogy tovább kell pároztatni az állatot olyan hímekkel vagy anyaállatokkal, amelyek termékenységéről már meggyőződtek, illetve a szaporítószerveket mikroszkóppal megvizsgálják, illetve az ivarzási ciklust vagy az ondóképződést ellenőrzik.

Alomszám

A termékenységi vizsgálat alatt kezelt állatokat a szokványos módon hagyják megelleni, és bárminemű külső beavatkozás nélkül hagyják, hogy utódaikat az elválasztásig neveljék.

Ha standardizálunk, az alábbi eljárás javasolt. Az ellés utáni első és negyedik nap között módosíthatjuk az egyes almok egyedszámát a létszám fölötti kölykök eltávolításával, hogy az eredmény – amennyire lehetséges – almonként négy hím és négy nőstény utód legyen. Ha a hím és nőstény utódok száma nem teszi lehetővé a nemenként négy azonos nemű utódot tartalmazó almok kialakítását, részleges kiegyenlítés is elfogadható (például öt hím és három nőstény). A nyolcnál kevesebb egyedet számláló almokban a kiegyenlítés nem lehetséges.

Megfigyelések

A vizsgálati időszak folyamán minden állatot naponta legalább egyszer meg kell figyelni. Feljegyzést kell készíteni a lényeges magatartászavarokról, az elhúzódó vagy nehéz ellés jeleiről, valamint a toxikus hatásra utaló minden egyéb tünetről, beleértve az elhullást is. A pároztatás előtt és a pároztatási időszak alatt a takarmányfogyasztást naponta kell mérni. Az ellés után és a szoptatás alatt a takarmányfogyasztás mérését (és az ivóvízfogyasztás mérését, ha a vizsgált anyagot az ivóvízben adtuk be) ugyanazon a napon kell elvégezni, mint az utódok testsúlymérését. A P generáció hímjeinek és nőstényeinek testsúlyát az adagolás megkezdésének napján kell megmérni, és ezt követően hetente meg kell ismételni a mérést. E megfigyeléseket minden felnőtt állatnál egyedenként kell rögzíteni.

A terhességi (gesztációs) időszakot a vemhesség nulladik napjától kell számolni. Minden utódot az ellést követően a lehető leghamarabb meg kell vizsgálni, és meg kell állapítani a kicsinyek számát és nemét, a halvaszületések arányát, valamint a durva rendellenességek jelenlétét.

A halva született és a negyedik napig elpusztított utódokat meg kell őrizni, és meg kell vizsgálni az esetleges születési rendellenességek szempontjából. Az élő utódokat az ellést követő reggelen meg kell számolni és testsúlymérést is kell végezni, majd ezt meg kell ismételni előbb a negyedik és hetedik napon, majd a vizsgálat végéig hetente, egyedileg mérve az állatokat.Az anyaállatokon vagy az utódokon észlelt fizikai és magatartásbeli rendellenességeket fel kell jegyezni.

Kórtan

Autopszia

A P generációhoz tartozó állatokat, ha azokat elpusztítják, illetve azok elpusztulnak a vizsgálat során, makroszkópos vizsgálatnak kell alávetni rendellenességeket vagy patológiás elváltozásokat keresve, különös tekintettel a szaporodási rendszer szerveire. Az elhullott, illetve haldokló kicsinyeket a rendellenességek szempontjából kell megvizsgálni.

Kórszövettan

A P generációhoz tartozó állatok petefészkeit, méhét, méhnyakát, hüvelyét, heréit, mellékheréjét, ondóhólyagját, prosztatáját, alvadékképző mirigyét, agyalapi mirigyét és célszervét/célszerveit el kell tenni mikroszkópos vizsgálatok céljaira. Abban az esetben, ha más, többféle dózissal végzett vizsgálatokban e szerveknek a vizsgálata nem történt meg, akkor valamennyi nagy adaggal kezelt és kontrollállat szóban forgó szerve esetében el kell végezni a mikroszkópos vizsgálatot, és – ha a gyakorlatban megoldható – ugyanez vonatkozik a menet közben elpusztult állatokra is.

Azon szerveket, amelyek az említett állatokban rendellenességeket mutatnak, a továbbiakban az összes többi P állatban is meg kell vizsgálni. Ezen esetekben az összes olyan szövetet mikroszkópos szövettani vizsgálatnak kell alávetni, amelyeken feltűnő kóros elváltozások mutatkoztak. Amint az a pároztatási eljárások ismertetése során javasolt volt, a feltehetően terméketlen állatok szervei esetében is elvégezhető a mikroszkópos vizsgálat.

2. ADATOK

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, amely minden vizsgálati csoportban megadja az állatok számát a vizsgálat kezdetén, a termékeny hím állatok számát, a vemhes nőstények számát, az elváltozások típusait és az egyes elváltozási fajtákat mutató állatok százalékos arányát.

Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni. Bármely elfogadott statisztikai módszer használható.

3. ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– felhasznált faj, törzs,

– a toxikus reakciók adatai nemenként és dózisonként, beleértve a termékenységet, a gesztációs időt és az életképességet is,

– az elhullás ideje a vizsgálat során, illetve, hogy az állatok megélték-e az elpusztítás tervezett időpontját, illetve a vizsgálat végét,
– egy táblázat az utódok súlyáról, a kicsinyek átlagos súlyáról, valamint a vizsgálat végén az egyes utódok súlyáról,
– a szaporodásra, az utódokra, illetve a születés utáni fejlődésre gyakorolt toxikus és egyéb hatások leírása,
– az egyes mérgezési tünetek megfigyelésének időpontja és a megfigyelést követő változásuk,
– testsúlyadatok a P generációnál,
– boncolási leletek,
– valamennyi mikroszkópos lelet részletes leírása,
– az eredmények statisztikai feldolgozása, ahol lehetséges,
– az eredmények megvitatása,
– az eredmények értelmezése.

3.2. **Értékelés és értelmezés**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

KÉTGENERÁCIÓS REPRODUKCIÓS TOXICITÁSVIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. Referenciaanyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A vizsgált anyagot naponta szájon át, fokozatosan növekvő adagokban adják be több kísérleti állatcsoportnak, hímeknek és nőstényeknek. A hímeknek a növekedés ideje alatt és legalább egy teljes csírasejtképzési cikluson keresztül (egérben megközelítőleg 56 nap, patkányban 70 nap) kell adni a vizsgált anyagot, hogy annak a csírasejtképzésre gyakorolt esetleges kedvezőtlen hatása kifejlődhessen.

A szülői (P) nemzedék nőstényeinek legalább két teljes párzási időszakon keresztül kell adagolni a vizsgált anyagot, hogy annak az ivarzási ciklusra gyakorolt esetleges kedvezőtlen hatása kifejlődhessen. Ezután a kísérleti állatokat pároztatják. A vizsgált anyagot a párzási időszak alatt mindkét nemnek adagolni kell, azt követően csak a nőstényeknek a vemhesség ideje alatt, valamint a szoptatási időszakban. Elválasztáskor a vizsgált anyag adagolását folytatják az F_1 utódnemzedékben, azok teljes fejlődési periódusában, párzási időszakában, az F_2 generáció létrehozásának időszakában, egészen az F_2 generáció elválasztásáig. Az anyag inhalációs adagolásához a módszer módosítást igényel.

1.5. Minőségi követelmények

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

Előkészületek

Az egészséges, fiatal állatokat a vizsgálat megkezdése előtt véletlenszerű kiválasztással kezelt és kontrollcsoportokba kell beosztani. A P generáció állatait a vizsgálat előtt legalább öt napon keresztül a vizsgálat tartási és takarmányozási körülményei között kell tartani. A vizsgált anyag ajánlott beadási módja: a takarmánnyal vagy az ivóvízzel. Más alkalmazási módok is elfogadhatók. A vizsgált anyagokat valamennyi állatnak azonos módszerrel kell adagolni a vizsgálat teljes időtartama alatt. Ha az adagolás megkönnyítésére vivőanyagot vagy más adalékanyagot használunk, meg kell bizonyosodni arról, hogy azok nem rendelkeznek toxikus hatással. Az adagolást hetente hét napon kell végezni.

A kísérlethez felhasznált állatok: a faj kiválasztása

A javasolt faj a patkány vagy az egér.

Korábban vizsgálatban még részt nem vett, egészséges P generációs állatokat kell használni. Rossz termékenységű törzsek nem használhatók. Az állatokat faj, törzs, nem, súly és/vagy kor szerint kell jellemezni.

A termékenység megállapítása érdekében mind a hím, mind a nőstény állatokat meg kell vizsgálni. Mind a kontroll, mind a kísérleti csoportban csak az elválasztást követően lehet megkezdeni a vizsgált anyag adagolását.

Az állatok száma és neme

Minden adagolási és kontrollcsoportnak elegendő állatot kell tartalmaznia ahhoz, hogy legalább 20 vemhes, illetve az elléshez közel álló nőstény legyen benne. Minden adagolási és kontrollcsoportnak elegendő állatot kell tartalmaznia, hogy legalább 20 vemhes és elléshez közel álló nőstény alkosson egy csoportot. A cél az, hogy megfelelő mennyiségű vemhességet és utódot hozzanak létre ahhoz, hogy felmérhető legyen az anyag hatása a termékenységre, a vemhességre és az anyai viselkedésre a szülői (P) nemzedékben, valamint a szopásra, a növekedésre és a fejlődésre az F_1 utódnemzedékben a fogamzástól a szoptatástól való elválasztásig és a fejlődésre az F_2 utódnemzedékben az elválasztásig.

Vizsgálati körülmények

Annyi élelmet és vizet kell adni, amennyire csak szükség van *(ad libitum)*. Az ellés előtt a vemhes nőstényeket el kell különíteni, elletőketrecekbe kell rakni, és az alom kialakításához használt (fészeképítő) anyaggal is el lehet látni őket.

Adagolási szintek (dózisok)

Legalább három adagolási szintet (dózist) és egy kontrollt kell használni. Ha az anyag beadásához vivőanyagot alkalmaznak, akkor a kontrollcsoportnak a vivőanyagból a felhasznált legnagyobb mennyiséget kell kapnia. Ha a vizsgált anyag csökkent táplálékfelvételt, illetve táplálékhasznosítást vált ki, szükség lehet egy korlátozott etetéssel tartott kontrollcsoport beállítására. Ideális esetben, ha azt a vizsgált anyag biológiai, illetve fizikokémiai tulajdonságai lehetővé teszik, a legnagyobb adaggal kezelt csoport szülőállataiban (P) ugyan jelentkeznie kell a toxikus hatásnak, de elhullásnak nem. A közepes adaggal kezelt csoport(ok)ban a vizsgált anyagnak tulajdonítható toxikus hatás minimális jeleinek kell megjelenni, és az alacsony adaggal kezelt csoportban az anyag nem okozhat észrevehető kedvezőtlen hatást sem a szülőknél, sem az utódoknál. Ha az állatok gyomorszondával vagy kapszulában kapják az adagot, azt az adott állat testsúlyára számítva kell adagolni, és hetente a testsúly változásaihoz kell igazítani. A vemhesség alatt a nőstények adagját szükség esetén a vemhesség nulladik, illetve hatodik napján mért testsúlyra számíthatjuk ki.

Határérték-vizsgálat

Alacsony toxicitású anyagoknál, ha az 1 000 mg/testsúlykilogramm, illetve az azt meghaladó dózis nem okoz semmilyen zavart a szaporodási képességben, a többi adagolási szinten végzett vizsgálatok szükségtelennek tekinthetők. Ha a nagy dózissal kezelt csoportban az anyára gyakorolt toxikus hatást egyértelműen mutató előzetes vizsgálatban nem volt észlelhető kedvezőtlen hatás a termékenység vonatkozásában, akkor a többi adagolási szinten végzett vizsgálat szükségtelennek tekinthető.

A kísérlet végrehajtása

Vizsgálati ütemterv

A szülői (P) nemzedék hímjeinél a napi adagolást az állatok öt- és kilenchetes kora között kell megkezdeni, miután a szoptatott állatokat elválasztották, és legalább öt napon keresztül a vizsgálati körülmények mellett tartották. A patkányoknál az adagolást a párzási időszak előtt 10 héten át kell folytatni (egér esetében ez az idő nyolc hét). A hímeket vagy a párzási időszakot követően kell elpusztítani és megvizsgálni, vagy a vizsgálati étrend mellett kell azokat tovább tartani egy esetleges második alom létrehozásához, majd nem sokkal a vizsgálat vége előtt kell elpusztítani és megvizsgálni.

A szülői nemzedék (P) nőstényeinél az ötnapos szoktatást követően kell megkezdeni a vizsgált anyag adagolását, és legalább a párzást két héttel megelőző időpontig kell folytatni. A P nőstényeknél a napi adagolást folytatni kell az egész háromhetes párzási időszak során és a vemhesség alatt, amíg az F_1 utódnemzedéket el nem választják. Az adagolás ütemezése szükséges lehet akkor, ha más információ is rendelkezésre áll a vizsgált anyagról, például annak anyagcsere-fokozó hatásairól vagy biológiai felhalmozódásáról.

A vizsgált anyag adagolása az F_1 állatok számára az elválasztásuktól veszi kezdetét, és egészen az állatok elpusztításáig tart.

Pároztatás

A reprodukciós toxicitásvizsgálatokban vagy 1:1 (egy hím-egy nőstény) vagy 1:2 (egy hím-két nőstény) párosítást lehet alkalmazni.

Az 1:1 arányú pároztatás esetén egy nőstényt addig kell ugyanazon hímmel együtt tartani, míg teherbe nem esett, vagy három hét időtartamig. A nőstényt minden reggel meg kell vizsgálni a sperma vagy a hüvelyi dugó jelenléte szempontjából. A vemhesség nulladik napjának azt a napot kell tekinteni, amikor megtaláljuk a hüvelyi dugót vagy a spermát.

Az ondóképződés sajátosságait is figyelembe véve az F_1 leszármazottakat addig nem szabad pároztatni, amíg el nem érték 11 hetes életkort egér, illetve a 13 hetes életkort patkány esetében. Az F_1 utódok pároztatásához a keresztpároztatás céljára almonként véletlenszerűen kell egy hím és egy nőstény állatot kiválasztani, és az azonos dóziscsoporthoz tartozó másik alom kicsinyével pároztatni az F_2 nemzedék létrehozása érdekében. A többi F_1 hímet és nőstényt az elválasztáskor el kell pusztítani.

A sikertelen párokat megvizsgálják annak megállapítása érdekében, hogy mi az oka a terméketlenségnek. Ez adott esetben azt jelentheti, hogy tovább pároztatják az állatot olyan hímekkel vagy anyaállatokkal, amelyek termékenységéről már meggyőződtek, illetve a szaporítószerveket mikroszkóppal megvizsgálják, illetve az ivarzási ciklust vagy az ondóképződést ellenőrzik.

Alomszám

A termékenységi vizsgálat alatt kezelt állatokat a szokványos módon hagyják megelleni, és bárminemű külső beavatkozás nélkül engedik, hogy utódaikat az elválasztásig neveljék.

Ha standardizálunk, az alábbi eljárás javasolt. Az ellés utáni első és negyedik nap között az egyes almok egyedszám tekintetében módosíthatók a létszám fölötti kölykök eltávolításával, hogy az eredmény – amennyire lehetséges – almonként négy hím és négy nőstény utód legyen. Ha a hím és nőstény utódok száma nem teszi lehetővé a nemenként négy azonos nemű utódot tartalmazó almok kialakítását, részleges kiegyenlítés is elfogadható (például öt hím és három nőstény). A nyolcnál kevesebb egyedet számláló almokban a kiegyenlítés nem lehetséges. Az F_2-es almok kiegyenlítése hasonló módon történik.

Megfigyelésekf

A vizsgálati időszak folyamán minden állatot naponta legalább egyszer meg kell figyelni. Feljegyzést kell készíteni a lényeges magatartásbeli változásokról, az elhúzódó vagy nehéz ellés jeleiről, valamint a toxikus hatásra utaló minden egyéb tünetről, beleértve az elhullást is. A pároztatás előtti és a pároztatási időszak alatt a takarmányfogyasztást naponta kell mérni. A takarmányfogyasztás napi mérése a vemhesség idején választható. Az ellés után és a szoptatás alatt a takarmányfogyasztás mérését ugyanazon a napon kell elvégezni, mint az utódok testsúlymérését. A szülők testsúlyát (P és F_1 állatokat) az adagolás megkezdésének napján és ezt követően hetente kell mérni.

E megfigyeléseket minden felnőtt állatnál egyedenként kell feljegyezni. A terhességi (gesztációs) időszakot a vemhesség nulladik napjától kell számolni. Minden utódot az ellést követően a lehető leghamarabb meg kell vizsgálni, és meg kell állapítani a kicsinyek számát és nemét, a halvaszületések arányát, valamint a durva rendellenességek jelenlétét.

A halva született és a negyedik napig elpusztított utódokat meg kell őrizni, és meg kell vizsgálni esetleges születési rendellenességek szempontjából. Az élő utódokat az ellést követő reggelen meg kell számolni, és testsúlymérést is kell végezni, majd ezt meg kell ismételni előbb a negyedik és hetedik napon, majd a vizsgálat végéig hetente, egyedileg mérve az állatokat. Az anyaállatokon vagy az utódokon észlelt fizikai és magatartásbeli rendellenességeket fel kell jegyezni.

Kórtan

Autopszia

Valamennyi P és F_1 generációhoz tartozó felnőtt állatot el kell pusztítani, ha már nincs szükség rájuk a szaporodási hatás értékeléséhez. A továbbtenyésztésre ki nem választott F_1-es utódokat és az F_2 generáció minden állatát el kell pusztítani az elválasztás után.

Az összes szülő állatot (P és F_1), ha azokat elpusztítják, illetve elpusztulnak a vizsgálat során, mikroszkópos vizsgálatnak kell alávetni rendellenességeket vagy patológiás elváltozásokat keresve, különös tekintettel a szaporodási rendszer szerveire. Az elhullott, illetve haldokló kicsinyeket a rendellenességek szempontjából kell megvizsgálni.

Kórszövettan

A P és F_1 generációhoz tartozó állatok petefészkeit, méhét, méhnyakát, hüvelyét, heréit, mellékheréjét, ondóhólyagját, prosztatáját, alvadékképző mirigyét, agyalapi mirigyét és célszervét/célszerveit el kell tenni mikroszkópos vizsgálatok céljaira. Abban az esetben, ha más, többféle dózissal végzett vizsgálatokban e szervek vizsgálata nem történt meg, akkor valamennyi nagy adaggal kezelt és kontroll-, pároztatásra kiválasztott P, illetve F_1 állat szóban forgó szerve esetében el kell végezni a mikroszkópos vizsgálatot, és – ha a gyakorlatban megoldható – ugyanez vonatkozik a menet közben elpusztult állatokra is. Azon szerveket, amelyek az említett állatokban rendellenességeket mutatnak, a továbbiakban az összes többi P állatban is meg kell vizsgálni. Ezen esetekben az összes olyan szövetet mikroszkópos szövettani vizsgálatnak kell alávetni, amelyeken feltűnő kóros elváltozások mutatkoztak. Mint azt a pároztatási eljárások ismertetése során javasoltuk, a feltehetően terméketlen állatok szervei esetében is elvégezhető a mikroszkópos vizsgálat.

2. **ADATOK**

Az eredmények kezelése

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, amely minden vizsgálati csoportban megadja az állatok számát a vizsgálat kezdetén, a termékeny hím állatok számát, a vemhes nőstények számát, az elváltozások típusait és az egyes elváltozási fajtákat mutató állatok százalékos arányát.

Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni. Bármely elfogadott statisztikai módszer használható.

3. **ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. **Vizsgálati jelentés**

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– felhasznált faj, törzs,

– a toxikus reakciók adatai nemenként és dózisonként, beleértve a termékenységet, a gesztációs időt és az életképességet is,

– az elhullás ideje a vizsgálat során, illetve, hogy az állatok megélték-e az elpusztítás tervezett időpontját, illetve a vizsgálat végét,

– egy táblázat az utódok súlyáról, a kicsinyek átlagos súlyáról, valamint a vizsgálat végén az egyes utódok súlyáról,

– a szaporodásra, az utódokra, illetve a születés utáni fejlődésre gyakorolt toxikus és egyéb hatások leírása,

– az egyes mérgezési tünetek megfigyelésének időpontja és a megfigyelést követő változásuk,

– testsúlyadatok a pároztatásra kiválasztott P és F_1 állatoknál,

– boncolási leletek,

– valamennyi mikroszkópos lelet részletes leírása,

– az eredmények statisztikai feldolgozása, ahol lehetséges,

– az eredmények megvitatása,

– az eredmények értelmezése.

3.2. **Értékelés és értelmezés**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét**.**

TOXIKOKINETIKAI VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. Referenciaanyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A vizsgált anyagot a megfelelő módon kell adagolni. A vizsgálat céljától függően a vizsgált anyagot egyszeri vagy ismételt dózisokban adhatjuk be, meghatározott időszakok alatt, egy vagy több kísérleti állatcsoportnak. Ezt követően a vizsgálat típusától függően az anyagot és/vagy annak anyagcseretermékeit meghatározzuk a testfolyadékokban, szövetekben és/vagy kiválasztott testnedvekben.

A meghatározást a vizsgált anyag jelölt és jelöletlen változatával is végezhetjük. Ha jelölést alkalmazunk, azt úgy kell kémiailag elhelyezni a vizsgált vegyületen, hogy az a legtöbb ismeretet közvetítse a vegyület szervezeten belüli sorsáról.

1.5. Minőségi követelmények

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

Előkészületek

Az állatokat a vizsgálat előtt legalább öt napon keresztül a vizsgálat tartási és takarmányozási körülményei között kell tartani. Az egészséges fiatal állatokat a vizsgálat megkezdése előtt véletlenszerű kiválasztással kezelt és kontrollcsoportokba kell beosztani. Különleges esetekben nagyon fiatal, vemhes vagy előkezelt állatok is használhatók.

Vizsgálati körülmények

A kísérlethez felhasznált állatok

A toxikokinetikai vizsgálatokat egy vagy több megfelelő állatfajon végezhetjük, de figyelembe kell venni az igénybe vett vagy használni szándékozott állatfajon az ugyanezen anyaggal végzett más toxikológiai vizsgálatokat is. Rágcsálók használatánál a súlybeli eltérés nem lehet nagyobb, mint az átlagérték ± 20 %-a.

Az állatok száma és neme

A felszívódási és kiválasztási vizsgálatokhoz kiinduláskor minden dóziscsoportban négy állatnak kell lennie. A nemek megválasztása nem kötelező, de bizonyos körülmények között mindkét nem vizsgálatára szükség lehet. Ha a reakció nemenként különbözik, mindkét nemből négy-négy állatot kell kezelni. Nem rágcsáló fajok esetében kevesebb állat is használható.

Ha a szöveti eloszlást vizsgáljuk, a kiindulási csoportméret kialakításakor figyelembe kell venni az egyes időpontokban elpusztítani szándékozott állatok és a vizsgálati időpontok számát is.

Ha az anyagcserét vizsgáljuk, a csoportok méretét a vizsgálat igényei határozzák meg.

Több dózissal és több időpontban végzett vizsgálatoknál a csoportméret kialakításakor figyelembe kell venni az egyes időpontokat és a tervezett elpusztítást, de a létszám két állatnál nem lehet kisebb. A csoportméret legyen elegendően nagy ahhoz, hogy elfogadhatóan jellemezze a vizsgált anyag és/vagy anyagcseretermékek felvételét, szintjének tetőzését és kiürülését (igény szerint).

Adagolási szintek (dózisok)

Egy dózisban történő beadás esetén legalább két adagolási szintet kell kialakítani. Egy alacsony dózist, ahol nincs észlelhető toxikus hatás, és egy nagy dózist, ahol a toxikokinetikai paraméterek változása, illetve a toxikus hatások megjelenése várható.

Az ismételt adagolással végzett vizsgálatnál az alacsony dózis rendszerint elegendő, de bizonyos körülmények között a nagy dózisra is szükség lehet.

Az adagolás módja

A toxikokinetikai vizsgálatokat azonos adagolási mód alkalmazásával kell végezni, és – ha van ilyen – ugyanazon vivőanyaggal, mint amelyet az egyéb toxikológiai vizsgálatoknál is használtunk, illetve használni szándékozunk. A vizsgált anyagot meghatározott időnként, rendszerint szájon át, gyomorszondával vagy a takarmánnyal adjuk be, a bőrre ecseteljük, illetve belélegeztetjük. A vizsgált anyag intravénás beadása akkor lehet hasznos, ha a többi adagolási módhoz viszonyított felszívódási arányt kívánjuk meghatározni. Az anyag intravénás beadását követően nem sokkal hasznos információt nyerhetünk az eloszlás mintázatáról.

Figyelembe kell venni annak lehetőségét is, hogy a vivőanyag és a vizsgált anyag között interferencia lép fel. Figyelmet kell fordítani arra, hogy a vizsgált anyag gyomorszondán át, illetve a takarmánnyal történő beadásakor a felszívódásnál lényeges különbségek állnak fenn, illetve figyelni kell a dózis pontos meghatározására különösen akkor, ha a vizsgált anyagot a takarmánnyal adják be.

Megfigyelési időszak

Valamennyi állatot naponta kell megfigyelni, és fel kell jegyezni a toxicitás jeleit, valamint az egyéb releváns klinikai tüneteket, beleértve azok kialakulásának idejét, súlyossági fokát és időtartamát.

A kísérlet végrehajtása

A vizsgálati állatok testsúlyának mérését követően a megfelelő módon kell beadni a vizsgált anyagot. Ha helyénvalónak tűnik, az állatokat a vizsgált anyag beadása előtt éheztetni lehet.

Felszívódás

A vizsgált anyag felszívódásának sebessége, illetve annak mértéke különféle módszerekkel határozható meg: referenciacsoportokkal, illetve azok nélkül [1], például az alábbi módszerekkel:

– a vizsgált anyag és/vagy anyagcseretermékek mennyiségi meghatározása a testnedvekben, például a vizeletben, az epesavban, a székletben, a kilélegzett levegőben, illetve a tetemben visszamaradó mennyiség mérése,

– a biológiai hatás összehasonlítása (például akut toxicitási vizsgálatok) a vizsgálati, és a kontroll-, illetve a referenciacsoportok között,

– a vese által kiválasztott anyag és/vagy anyagcseretermék mennyiségének összehasonlítása a vizsgálati és a referenciacsoportok között,

– a plazmaszint változás időbeli függvényén a görbe alatti terület meghatározása a vizsgált anyag és/vagy annak anyagcseretermékei vonatkozásában, majd ezek egybevetése a referenciacsoportok adataival.

[1] A jelen módszer vonatkozásában referenciacsoportnak azt a csoportot tekintjük, amelynek tagjai részére valamely más, az adott dózis teljes körű biológiai hozzáférhetőségét biztosító módon adjuk be a vizsgált anyagot

Eloszlás

Az eloszlási minta elemzésére jelenleg két lehetőség áll rendelkezésre, amelyeket önmagukban, illetve kombinálva lehet alkalmazni:

– hasznos minőségi információ nyerhető az egésztest-autoradiográfiás technikákkal,

– mennyiségi információ nyerhető, ha az állatokat az expozíciót követően különböző időpontokban elpusztítják, és meghatározzák a vizsgált anyag és/vagy anyagcseretermékek koncentrációját, valamint mennyiségét a szervekben és szövetekben.

Kiválasztás

A kiválasztás vizsgálatakor vizeletet, székletet, kilélegzett levegőt és bizonyos esetekben epét kell gyűjteni. Az expozíciót követően több alkalommal kell mérni a vizsgált anyag és/vagy anyagcseretermékek mennyiségét az említett testnedvekben, vagy addig, amíg a beadott adag mintegy 95 %-a ki nem választódott, vagy hét napon keresztül, attól függően, hogy melyik következik be előbb.

Különleges esetekben a vizsgált anyagnak a szoptató vizsgálati állatok tejében való kiválasztását is mérni lehet.

Anyagcsere

Az anyagcsere mértékének és mintázatának meghatározásához biológiai mintákat kell elemezni megfelelő módszerek alkalmazásával. Az anyagcseretermékek szerkezetét meg kell ismerni, és a megfelelő anyagcsere útvonalakat meg kell találni, ha korábbi toxikológiai vizsgálatok révén felmerült kérdések megválaszolásához erre igény van. Az anyagcsere-útvonalakról szerzett ismeretek megszerzésében *in vitro* vizsgálatok is hasznosak lehetnek.

Az anyagcsere és a toxikus hatás közötti kapcsolatról további ismeretek szerezhetők biokémiai vizsgálatokkal, például a metabolizáló enzimrendszerekre, az endogén, nem fehérje jellegű szulfhidril-vegyületek fogyására gyakorolt hatás és a vizsgált anyag makromolekulákhoz való kötődésének meghatározásával.

2. ADATOK

Az elvégzett vizsgálat típusától függően az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, és – ahol szükséges – grafikusan is ábrázolni kell. Ha szükségesnek tartjuk, akkor minden vizsgálati csoport esetében ábrázolni kell az átlagot, valamint a statisztikai eltéréseket az idő, a dózis, a szövetek és a szervek tekintetében. A felszívódás mértékét, a kiválasztott mennyiséget és ezek sebességét a megfelelő módszerekkel kell meghatározni. Ha az anyagcsere-termékek vizsgálatát végzik el, meg kell adni az azonosított metabolitok szerkezetét és a lehetséges anyagcsere-útvonalakat, amelyen képződnek.

3. ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– használt faj, törzs, az állatok származása, tartási körülmények, étrend,

– a jelölt anyagok jellemzése, ha használtunk ilyet,

– dózisok és adagolási időközök,

– az adagolás módja(i) és vivőanyag, ha van,

– toxikus és egyéb megfigyelt hatások,

– a vizsgált anyag és/vagy anyagcsere termékének meghatározási módja a biológiai mintákban, beleértve a kilélegzett levegőt is,

– az eredmények táblázatos összefoglalása nemek, dózisok, kezelési protokollok, idő, szövetek, illetve szervek szerint,

– a felszívódás és kiválasztás mértékének ábrázolása az idő függvényében,
– a metabolitok jellemzésének és azonosításának módszerei a biológiai mintákban,
– az anyagcseréhez kapcsolódó biokémiai mérési módszerek,
– lehetséges anyagcsere-útvonalak,
– az eredmények megvitatása,
– az eredmények értelmezése.

3.2. **Értékelés és értelmezés**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

MUTAGENITÁSVIZSGÁLAT ÉS A RÁKKELTŐ HATÁS SZŰRÉSE

GÉNMUTÁCIÓ VIZSGÁLATA *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*-BEN

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd az Általános bevezetés B részét.

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd az Általános bevezetés B részét.

1.3. Referenciaanyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A *Saccharomyces cerevisiae* nevű élesztőgomba számos haploid, illetve diploid törzse használható fel arra, hogy a vizsgált vegyület által metabolikus aktivációval, illetve a nélkül kiváltott génmutáció jelenléte kimutatható legyen.

Haploid törzsekben kialakított, előrehaladó mutációs rendszereket kell felhasználni, például a vörös, adeninfüggő élesztőgombák *(ade-1, ade-2)* mutációját, illetve kettős adeninfüggő fehér mutánsokat, illetve olyan szelektív rendszereket, mint a kanavnain és a cikloheximid rezisztencia-indukciója.

A leginkább értékelt reverz mutációs rendszer a haploid XV 185-14C törzset alkalmazza, amely az *ade 2-1, arg 4-17, lys* 1-1 *és trp* 5-48 „ochre" nonszensz mutációkat hordozza; ezek bázis-szubsztitúció típusú mutációt kiváltó mutagénekkel visszafordíthatók, amelyek helyspecifikus, illetve „ochre" szupresszor mutációkat váltanak ki. Az XV 185-14C jelzésű élesztőgombatörzs hordozza a *his* 1-7 markert is, egy főként második helyet érintő mutációkkal visszafordítható „missense" mutációt, valamint a *hom* 3-10 markert, amelyet kereteltolódást („frameshift") okozó mutagének fordítanak meg.

Diploid *S. cerevisiae* törzsekben az egyetlen általánosan használt törzs a D_7, amely az *ilv* 1-92 mutációra homozigóta.

1.5. Minőségi követelmények

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

Előkészületek

A vizsgált vegyületek oldatait és a kontrollt a megfelelő vivőanyag felhasználásával közvetlenül a vizsgálat megkezdése előtt kell elkészíteni. Vízben nem oldódó szerves vegyületek esetében 2 térfogat-százalékos koncentrációt nem meghaladó szerves oldószer, például etanol, aceton vagy dimetil-szulfoxid (DMSO) használható. A vivőanyag a végső koncentrációban nem befolyásolhatja jelentősen a sejtek életképességét és növekedési jellemzőit.

Az anyagcsere aktiválása

A sejteket a vizsgált vegyület hatásának egy megfelelő exogén anyagcsere-aktiváló rendszer jelenlétében és hiányában is ki kell tenni.

A leggyakrabban használt rendszer az enzimindukáló szerrel előkezelt rágcsálómájszövetből készített poszt-mitokondriális frakció ko-faktorral kiegészítve. Az anyagcsere-aktiválásra más fajok, szövetek, poszt-mitokondriális frakciók vagy eljárások használata is alkalmas lehet.

Vizsgálati körülmények

Indikátor törzsek

A génmutációs vizsgálatok során leggyakrabban alkalmazott törzs a haploid XV 185-14C és a diploid, D_7 jelzésű törzs. Más törzsek is megfelelőek lehetnek.

Tápoldatok

A mutáns- és a túlélősejt-számok meghatározásához a megfelelő tenyésztési tápoldatokat kell alkalmazni.

Pozitív és negatív kontrollok használata

Pozitív, kezeletlen és oldószeres kontrollokat egyidejűleg kell alkalmazni. Minden egyes mutációs végponthoz a megfelelő pozitív kontrollvegyületeket kell használni.

Expozíciós koncentráció

A vizsgált anyagnak legalább öt, egyenletesen elosztott koncentrációját kell alkalmazni. Mérgező anyagoknál a legnagyobb vizsgált koncentráció a túlélési arányt nem csökkentheti 5–10 %-ot meghaladó mértékben. Vízben viszonylag rosszul oldódó anyagokat a megfelelő eljárások alkalmazásával oldhatóságuk határáig kell vizsgálni. A vízben jól oldódó és nem mérgező anyagok felső koncentrációját esetenként kell meghatározni.

Inkubációs körülmények

A lemezeket négy-hét napig 28–30 °C hőmérsékleten, sötétben kell inkubálni.

Spontán mutációs gyakoriság

Az általánosan elfogadott normál tartományon belüli spontán mutációs gyakorisággal rendelkező szubkultúrákat kell használni.

A lemezek száma

A génmutációval előállított prototrófok, illetve a sejtéletképesség vizsgálatára valamennyi koncentráció esetében legkevesebb három lemezt kell alkalmazni. A *hom* 3-10-hez hasonló alacsony mutációs gyakoriságú markereket használó meghatározások során azonban meg kell növelni a lemezek számát, hogy statisztikailag értékelhető mennyiségű adatot kapjunk.

A kísérlet végrehajtása

A *S. cerevisiae* törzsek kezelését rendszerint folyékony közeges eljárással végezzük, amely stabil vagy növekedési fázisban levő sejteket alkalmaz. Az induló vizsgálatokat osztódó sejteken kell végezni: folyamatos rázás mellett 1–5 x 10^7 sejt/ml koncentrációjú élesztőgombát kezelnek a vizsgált anyaggal legfeljebb 18 órán át, 28–37 °C hőmérsékleten; ha szükséges, a megfelelő mennyiségben anyagcsere-aktiváló rendszert is adnak hozzá kezelés közben. A kezelés végén a sejteket centrifugálják, kimossák, és megfelelő táptalajon szétterítik. Inkubáció után a lemezeken kell megszámolni a túlélő sejteket és a génmutáció kialakulását.

Ha az első vizsgálat negatív eredményt ad, egy második meghatározást is kell végezni, stabil, nem osztódó sejtek felhasználásával. Ha az első vizsgálat pozitív, azt egy megfelelő független kísérlettel kell megerősíteni.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, megadva a megszámolt telepek számát, a mutánsok számát, a túlélési arányt és a mutációs gyakoriságot. Valamennyi eredményt független vizsgálatokkal kell megerősíteni. Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni.

3. **ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. **Vizsgálati jelentés**

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– a felhasznált törzs,

– a vizsgálat körülményei: stabil, nem osztódó állapotú vagy osztódó sejtek, a tápfolyadékok összetétele, az inkubációs hőmérséklet és időtartam, az anyagcsere-aktiváló rendszer,

– kezelési körülmények: koncentrációk, a kezelési eljárás és időtartama, a kezelési hőmérséklet, a pozitív és negatív kontrollok,

– a megszámolt telepek mennyisége, a mutánsok száma, a túlélési arány és a mutációs gyakoriság, a dózis-hatás összefüggés, ha alkalmas, az adatok statisztikai értékelése,

– az eredmények megvitatása,

– az eredmények értelmezése.

3.2. **Értékelés és értelmezés**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

MITOTIKUS REKOMBINÁCIÓ-VIZSGÁLAT *SACHAROMYCES CEREVISIAE*-BEN

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. Referenciaanyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A *Saccharomyces cerevisiae* élesztőgomba esetében a mitotikus rekombináció két gén között (vagy még gyakrabban egy gén és annak centromerje között), illetve géneken belül mutatható ki. A két gén közötti eseményt mitotikus átkereszteződésnek (crossing over) nevezzük, és eredménye egy reciprok termék, míg a génkonverziónak nevezett, génen belüli esemény leggyakrabban nem reciprok jellegű. Az átkereszteződés rendszerint recesszív homozigóta telepek vagy szektorok előállításával mutatható ki heterozigóta törzsekben, míg a génkonverzió ugyanazon gén két hibás alléljét hordozó auxotróf heteroallélikus törzsben előállított prototróf revertáns révén vizsgálható. A mitotikus génkonverzió kimutatásához leggyakrabban alkalmazott törzs a D_4 (*ade 2* és *trp* 5 lokuszon heteroallélikus), a D_7 (a *trp* 5 lokuszon heteroallélikus), a BZ_{34} (heteroallélikus az *arg 4* lokuszon) és a JDl (heteroallélikus a *his 4* és *trp 5* lokuszon). A vörös és a rózsaszín homozigóta szektorokat termelő mitotikus átkereszteződés kimutatására a D_5 vagy a D_7 jelzésű törzset használhatjuk (amelyek egyaránt kimutatják a mitotikus génkonverziót és az *ilv* 1-92 helyen kialakuló reverz mutációt is). Mindkét törzs heteroallélikus az *ade 2* komplementer alléljai szempontjából.

1.5. Minőségi követelmények

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

Előkészületek

A vizsgált vegyületek oldatait és a kontrollt a megfelelő vivőanyag felhasználásával közvetlenül a vizsgálat megkezdése előtt kell elkészíteni. Vízben nem oldódó szerves vegyületek esetében 2 térfogat-százalékos koncentrációt nem meghaladó szerves oldószer, például etanol, aceton vagy dimetil-szulfoxid (DMSO) használható. A vivőanyag a végső koncentrációban nem befolyásolhatja jelentősen a sejtek életképességét és növekedési jellemzőit.

Az anyagcsere aktiválása

A sejteket a vizsgált vegyület hatásának egy megfelelő exogén anyagcsere-aktiváló rendszer jelenlétében és hiányában is ki kell tenni. A leggyakrabban használt rendszer az enzimindukáló szerrel előkezelt rágcsálómáj-szövetből készített poszt-mitokondriális frakció ko-faktorral kiegészítve. Az anyagcsere-aktiválásra más fajok, szövetek, poszt-mitokondriális frakciók vagy eljárások használata is alkalmas lehet.

Vizsgálati körülmények

Indikátor törzsek

A leggyakrabban alkalmazott törzs a diploid D_4, D_5, D_7 és JD1 jelzésű törzsek. Más törzsek is megfelelőek lehetnek.

Tápoldatok

A túlélő sejtek és a mitotikus rekombináció gyakoriságának meghatározásához a megfelelő tenyésztési tápoldatokat kell alkalmazni.

Pozitív és negatív kontrollok használata

Pozitív, kezeletlen és oldószeres kontrollokat egyidejűleg kell alkalmazni. Minden egyes rekombinációs végponthoz a megfelelő pozitív kontrollvegyületeket kell használni.

Expozíciós koncentráció

A vizsgált anyagnak legalább öt, egyenletesen elosztott koncentrációját kell alkalmazni. A figyelembe veendő tényezők közé tartozik a citotoxicitás és az oldhatóság. A legalacsonyabb koncentráció nem befolyásolhatja a sejtek életképességét. Mérgező anyagoknál a legnagyobb vizsgált koncentráció nem csökkentheti a túlélési arányt 5–10 %-ot meghaladó mértékben. Vízben viszonylag rosszul oldódó anyagokat a megfelelő eljárások alkalmazásával oldhatóságuk határáig kell vizsgálni. A vízben jól oldódó és nem mérgező anyagok felső koncentrációját esetenként kell meghatározni.

A sejteket nyugalmi, nem osztódó állapotban vagy osztódáskor kell a vizsgált anyaggal legfeljebb 18 órán keresztül kezelni. Mindazonáltal a hosszú kezelési idők alatt a sejtkultúrát mikroszkóppal kell vizsgálni, hogy nem képződtek-e spórák, amelyek jelenléte érvénytelenné teszi a vizsgálatot.

Inkubációs körülmények

A lemezeket négy-hét napig 28–30 °C hőmérsékleten, sötétben kell inkubálni. A mitotikus átkereszteződés révén képződött vörös és rózsaszín homozigóta szektorok kimutatására használt lemezeket még további egy vagy két napig kell hűtve (körülbelül 4 °C-on) tartani a számlálás előtt a megfelelő, pigmentált telepek kifejlődése érdekében.

Spontán mitotikus rekombinációs gyakoriság

Általánosan elfogadott, normál spontán mitotikus rekombinációs gyakorisággal rendelkező szubkultúrákat kell használni.

A lemezek száma

A génmutáció révén keletkezett prototrófok, illetve a sejtéletképesség vizsgálatára valamennyi koncentráció esetében legkevesebb három lemezt kell egyidejűleg alkalmazni. A mitotikus átkereszteződés által létrehozott recesszív homozigózis vizsgálatakor azonban meg kell növelni a lemezek számát, hogy megfelelő mennyiségű telepet kapjunk.

A kísérlet végrehajtása

A *S. cerevisiae* törzsek kezelését rendszerint folyékony közeges eljárással kell végezni, amely stabil vagy növekedési fázisban levő sejteket alkalmaz. Az induló vizsgálatokat osztódó sejteken kell végezni: folyamatos rázás mellett 1–5 x 10^7 sejt/ml koncentrációjú élesztőgombát kell kezelni a vizsgált anyaggal legfeljebb 18 órán át, 28–37 °C hőmérsékleten; ha szükséges, a megfelelő mennyiségben anyagcsere-aktiváló rendszert is adunk hozzá kezelés közben.

A kezelés végén a sejteket centrifugálni kell, ki kell mosni, és megfelelő táptalajon szét kell teríteni. Inkubáció után a lemezeken meg kell számolni a túlélő sejteket és a génmutáció kialakulását.

Ha az első vizsgálat negatív eredményt ad, egy második meghatározást is kell végezni, stabil, nem osztódó sejtek felhasználásával. Ha az első vizsgálat pozitív, azt egy megfelelő független kísérlettel kell megerősíteni.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, megadva a megszámolt telepek számát, a rekombinánsok számát, a túlélési arányt és a rekombinációs gyakoriságot.

Valamennyi eredményt független vizsgálatokkal kell megerősíteni.

Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni.

3. **ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. **Vizsgálati jelentés**

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– a felhasznált törzs,

– a vizsgálat körülményei: stabil, nem osztódó állapotú vagy osztódó sejtek, a tápfolyadékok összetétele, az inkubációs hőmérséklet és időtartam, az anyagcsere-aktiváló rendszer,

– kezelési körülmények: koncentrációk, a kezelési eljárás és időtartama, a kezelési hőmérséklet, a pozitív és negatív kontrollok,

– a megszámolt telepek mennyisége, a rekombinánsok száma, a túlélési arány és a rekombinációs gyakoriság, a dózis-hatás összefüggés, ha alkalmas, az adatok statisztikai értékelése,

– az eredmények megvitatása,

– az eredmények értelmezése.

3.2. **Értékelés és értelmezés**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

IN VITRO EMLŐSSEJTGÉNMUTÁCIÓ-VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. Referenciaanyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

Az emlőssejtkultúra-rendszerek felhasználhatók a vegyi anyagok által kiváltott mutációk kimutatására. A széles körben alkalmazott sejtvonalak közé tartozik az L5178Y jelzésű egér-limfómasejtvonal és a kínai hörcsögből származó CHO, illetve V-79 jelzésű sejtvonalak. E sejtvonalakban a leggyakrabban használt rendszerek a timidin-kináz (TK), a hipoxantin-guanin-foszforibozil-transzferáz (HPRT) ([1]) és a Na^+/K^+ ATPáz lokuszokon keletkezett mutációkat mutatják ki. A TK és HPRT mutációs rendszerek bázispár-mutációkat, kereteltolódási (frameshift) mutációkat és kisméretű delíciókat észlelnek; a Na^+/K^+-rendszerrel kizárólag bázispár-mutációk vizsgálhatók.

A $TK^+ - TK^-$ előrefelé haladó mutáció miatt a timidin-kináz (TK) enzimre nézve hiányos sejtek rezisztensek bróm-dezoxiuridinnal (BrdU), fluór-dezoxiuridinnal (FdU), illetve trifluór-timidinnel (TFT) szemben, mivel ezen antimetabolitokat a timidin-kináz hulladékhasznosító enzimrendszer nem építi be a sejt nukleotidjaiba; a sejtanyagcseréhez szükséges nukleotidokat a sejt kizárólag *de novo* szintézissel állítja elő. Timidin-kináz jelenlétében azonban a BrdU, a FdU illetve a TFT beépül a nukleotidokba, aminek eredménye a sejtanyagcsere gátlása és a citotoxicitás. A mutáns sejtek tehát burjánzanak BrdU, FdU, illetve TFT jelenlétében, míg a normál, timidin-kinázt tartalmazó sejtek nem. A fentiekhez hasonló módon a HPRT-hiányossejtek 8-azaguaninnal (AG), illetve 6-tioguaninnal (TG) szembeni rezisztencia alapján szelektálhatók. A megváltozott Na^+/K^+ ATPáz rendszerű sejtek pedig az ouabainnal szembeni rezisztencia alapján szelektálhatók.

A citotoxicitást a vizsgált anyagnak a sejtkultúrák kolóniaképző képességére (klónozási hatékonyság), illetve a sejtkultúrák növekedési sebességére gyakorolt hatásával kell meghatározni. A mutációs gyakoriságot ismert mennyiségű sejt mutációt hordozó sejtek kimutatására alkalmas szelektív szert tartalmazó tenyésztőoldathoz történő keverése révén, valamint a túlélő sejtek arányának mérésére alkalmas szelektív szer nélküli tenyésztőoldathoz történő keverése révén kell meghatározni. Megfelelő inkubációs idő elteltével kell meghatározni a sejtkolóniák számát. A mutációs gyakoriságot a sejttúléléssel korrigált mutáns telepek számából számítják ki.

1.5. Minőségi követelmények

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

Előkészületek

Sejtek

Számos sejtvonal áll rendelkezésre a szóban forgó vizsgálathoz. Ide tartoznak az L5178Y szubklónok, a CHO-sejtek illetve a V-79 sejtek, amelyek kémiai mutagének iránti érzékenysége már ismert, amelyeknek nagy a klónozási hatékonysága, és amelyeknél kicsi a spontán mutációs gyakoriság. A sejteket időről időre ellenőrizni kell a kariotípus stabilitása és a Mycoplasma-szennyeződés szempontjából. Más sejttípusok is használhatók, ha alkalmasságuk a kémiailag indukált génmutációk vizsgálatára teljes körűen dokumentálható.

([1]) Korábban HGPRT.

Médiumok

Megfelelő tenyésztőoldatok és inkubációs körülmények (pl. hőmérséklet, alkalmazott tenyésztőedények, CO_2-koncentráció, illetve páratartalom) használatára van szükség. A tenyésztőoldatokat és szérumokat a vizsgálathoz használt szelektív rendszerek és sejttípusok igényeinek megfelelően kell megválasztani.

Vizsgált anyag

A vizsgált anyagokat a sejtek kezelését megelőzően a tenyésztőoldatban kell előkészíteni, vagy megfelelő vivőanyagban feloldani, illetve szuszpendálni. A vivőanyag a kultúrában kialakuló végső koncentrációban nem érintheti a sejtek életképességét és szaporodását.

Anyagcsere-aktiválás

A sejteket a vizsgált vegyület hatásának megfelelő anyagcsere-aktiváló rendszer jelenlétében és hiányában egyaránt ki kell tenni. A másik lehetőség, hogy belső metabolikus aktivitással rendelkező sejttípusokat használunk, ám ilyenkor az aktivitás jellegét és mértékét ismerni kell, hogy az megfeleljen a vizsgált kémiai osztálynak.

Vizsgálati körülmények

Pozitív és negatív kontrollok használata

Minden vizsgálatnak pozitív kontrollként tartalmaznia kell egy közvetlenül ható vegyületet és egy metabolikus aktiválást igénylő vegyületet is; ezenkívül negatív (vivőanyag-) kontrollt is kell használni.

Néhány példa a pozitív kontrollként felhasználható anyagokra:

– közvetlenül ható vegyületek:

  – etil-metán-szulfonát,

  – hikanton,

– közvetve ható vegyületek:

  – 2-acetilamino-fluorén,

  – 7,12-dimetil-benzantracén,

  – N-nitrozo-dimetil-amin.

Ahol szükséges, alkalmazni lehet még egy pozitív kontrollt is, amely a vizsgált anyaggal egyező vegyületosztályba tartozik.

Expozíciós koncentráció

A vizsgált anyag több koncentrációját kell alkalmazni. E mennyiségeknek koncentrációfüggő mérgező hatást kell eredményezniük, amelyek jellemzője, hogy a legnagyobb vizsgált koncentrációval alacsony túlélési arány jár, míg a legalacsonyabb koncentrációval kezelt csoportban a túlélés megközelítőleg megegyezik a negatív kontrollcsoportéval.

Vízben viszonylag rosszul oldódó anyagokat a megfelelő eljárások alkalmazásával oldhatóságuk határáig kell vizsgálni. A vízben jól oldódó és nem mérgező anyagok felső koncentrációját esetenként kell meghatározni.

A kísérlet végrehajtása

A kultúránkénti sejtszám kapcsolatban kell, hogy legyen a spontán mutációs gyakorisággal; általános szabály, hogy a spontán mutációs ráta reciprokának tízszeresét kitevő életképes sejtet kell alkalmazni.

A sejteket megfelelő ideig, legtöbb esetben két–öt óráig kell az anyaggal kezelni. A belső metabolikus aktivitással nem rendelkező sejteket a megfelelő metabolikus aktiválórendszer jelenlétében, illetve hiányában is kezelni kell a vizsgált anyaggal. A kezelés végén a sejtkultúrából kimossák a vizsgált anyagot, és ilyen állapotban tenyésztik ki az életképesség meghatározására, valamint a mutáns fenotípusok kifejeződésének érdekében.

Az expressziós időszak végén, amelynek elég hosszúnak kell lennie ahhoz, hogy az indukált mutánsok közel optimális fenotípusos megnyilvánulását tegye lehetővé, a sejteket tenyésztő oldatban tenyésztik ki szelektív szerek jelenlétében, illetve hiányában, az életképesség és a mutánsok számának meghatározása érdekében.

Valamennyi eredményt független vizsgálatokkal kell megerősíteni.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni. A vizsgált anyag és a kontrollok egyedi tenyésztési értékeit mind a mutációs indukció, mind a túlélés szempontjából be kell mutatni. Meg kell adni a lemezenkénti átlagos kolóniaszámot, valamint a normál szórást is. A mutációs gyakoriságot a túlélő sejtekre eső mutánsok számával kell kifejezni. A túlélési arányt és a klónozási hatékonyságot a kontrollszint százalékában kell megadni.

Az adatokat megfelelő statisztikai módszerekkel kell értékelni.

3. **ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. **Vizsgálati jelentés**

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– a felhasznált sejtvonal, a sejtkultúrák száma, a sejtkultúrák fenntartásának módszere,

– a vizsgálat körülményei: a tenyésztési oldatok összetétele, a szén-dioxid-koncentráció, a vizsgált anyag koncentrációja, az inkubációs hőmérséklet és időtartam, az expressziós időszak hossza (a kiindulási sejtszámot és szükség esetén a szubkultúrákat, a táplálási ütemtervet is beleértve, amennyiben az releváns), a kezelés időtartama, a sejtsűrűség a kezelés alatt, a felhasznált emlősanyagcsere-aktiváló rendszer, a pozitív és a negatív kontroll, a használt szelektív szer,

– a dózisok megválasztásának indokolása,

– az életképes és a mutáns sejtek megszámlálásához használt módszer,

– az eredmények statisztikai feldolgozása,

– az eredmények megvitatása,

– az eredmények értelmezése.

3.2. **Értékelés és értelmezés**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

DNS-KÁROSODÁS ÉS -REPARÁCIÓ – NEM TERVEZETT DNS-SZINTÉZIS (UNSCHEDULED DNA SYNTHESIS, UDS) – EMLŐSSEJTEK IN VITRO

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. Referenciaanyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A nem szabályszerű DNS-szintézis- („unscheduled DNA synthesis", UDS) vizsgálat a kémiai vagy fizikai hatással indukált károsodás területéről kimetszett és eltávolított DNS-szakasz helyreállításához szükséges DNS-szintézist vizsgálja. A meghatározás alapja a tríciummal jelölt timidin (^{3}H-TdR) beépülése olyan emlőssejtek DNS-molekuláiba, amelyek nem a sejtciklus S fázisában vannak. A ^{3}H-TdR felvétele a kezelt sejtek DNS-molekuláiba autoradiográfiás technikával vagy folyadékszcintillációval (LSC = liquid scintillation counting) mérhető. Azt az esetet kivéve, amikor primer patkány májsejtet alkalmaznak, a kultúrában tenyésztett emlőssejteket exogén anyagcsere-aktiváló rendszer jelenlétében, illetve hiányában kezelik a vizsgált anyaggal. Az UDS folyamata *in vivo* rendszerekben is mérhető.

1.5. Minőségi követelmények

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

Előkészületek

A vizsgált anyagokat, a kontroll-, illetve a referenciaanyagokat a sejtek kezelését megelőzően tápfolyadékban kell előkészíteni, vagy a megfelelő vivőanyagban feloldani, illetve szuszpendálni, majd a tápfolyadékban tovább hígítani a vizsgálathoz használatos mértékben. A vivőanyag végső koncentrációja a kultúrában nem befolyásolhatja a sejtek életképességét.

A vizsgálathoz patkánymájsejtek, illetve emberi limfociták primer kultúrái vagy stabil sejtvonalak (például emberi diploid fibroblasztok) használhatók.

A sejteket a vizsgált vegyület hatásának megfelelő emlősanyagcsere-aktiváló rendszer jelenlétében és hiányában is ki kell tenni.

Vizsgálati körülmények

A kultúrák száma

Legalább két kultúra kell minden vizsgálati ponton az autoradiogáfiás mérésekhez és hat kultúra (vagy ennél kevesebb, ha tudományosan megindokolható) az LSC UDS-meghatározáshoz.

Pozitív és negatív kontrollok használata

Minden vizsgálathoz alkalmazni kell egyidejűleg pozitív és negatív (kezeletlen és/vagy vivőanyag-) kontrollt, metabolikus aktiválással és a nélkül.

A patkánymájsejt-vizsgálat pozitív kontrolljai sorában említendő a 7,12-dimetil-benzantracén (7,12-DMBA), illetve a 2-acetilamin-fluorén (2-AAF). Stabil sejtvonalak használata esetén a 4-nitrokinolin-N-oxid (4-NQO) lehet példa a pozitív kontrollra mind az autoradiográfiás, mind a folyadékszcintillációs módszer számára metabolikus aktiválás nélkül; ha metabolikus aktiválórendszereket is alkalmazunk, az N-dimetil-nitrózamin lehet a pozitív kontroll.

Expozíciós koncentráció

A vizsgált anyagnak több, egyenletesen elosztott koncentrációját kell alkalmazni. A legnagyobb vizsgált koncentráció bizonyos fokú citotoxicitást kell, hogy mutasson. Vízben viszonylag rosszul oldódó anyagokat a megfelelő eljárások alkalmazásával oldhatóságuk határáig szükséges vizsgálni. A vízben jól oldódó és nem mérgező anyagok felső koncentrációját esetenként kell meghatározni.

Sejtek

A sejtkultúrák fenntartását a megfelelő tápfolyadékban, CO_2-koncentráció, páratartalom és hőmérséklet mellett kell végezni. A stabil sejtvonalakat időnként ellenőrizni kell a *Mycoplasma*-szennyeződés szempontjából.

Anyagcsere-aktiválás

Metabolikus aktiválórendszert primer májsejteken nem kell alkalmazni. A stabil sejtvonalakat és a limfocitákat a vizsgált anyaggal mind a megfelelő metabolikus aktiváló rendszer jelenlétében, mind annak hiányában kezelni kell.

A kísérlet végrehajtása

A sejtkultúrák elkészítése

Stabil sejtvonalakat kell törzstenyészetekből (például tripszines emésztéssel vagy rázással) létrehozni, ezeket megfelelő sűrűségben tenyésztőedényekbe kell áttenni, és 37 °C-on inkubálni.

Patkánymájsejtek rövid távú tenyészeteit úgy hozzák létre, hogy a frissen disszociált májsejteket megfelelő tápfolyadékban hagyják megtapadni a növekedési felületen.

Emberi limfocitatenyészeteket hozunk létre a megfelelő technikák alkalmazásával.

A sejttenyészetek kezelése a vizsgált anyaggal

Primer patkánymájsejtek

Frissen izolált patkánymájsejteket megfelelő időn keresztül ^{3}H-TdR-t tartalmazó tápfolyadékban kezelik a vizsgált anyaggal. A kezelési idő végén a tápfolyadékot leszívják a sejtekről, amelyeket leöblítenek, fixálnak és megszárítanak. A tárgylemezeket autoradiográfiás emulzióba merítik (vagy filmcsíkokat is használhatunk), exponálják, előhívják, megfestik és kiértékelik.

Stabil sejtvonalak és limfociták

Autoradiográfiás technikák: A sejttenyészetet a megfelelő ideig kezeljük a vizsgált anyaggal, majd ezt követően ^{3}H-TdR-el. A kezelési idő a vizsgált anyag jellegétől, a metabolizáló rendszerek aktivitásától és a sejtek típusától függ. Az UDS maximumának észleléséhez a vizsgált anyaggal együtt vagy néhány perccel a vizsgált anyag adása után ^{3}H-TdR-t adnak a rendszerhez. A kétféle eljárás közötti választás attól függ, van-e kölcsönhatás a vizsgált anyag és a ^{3}H-TdR között. Az UDS és a félig konzervatív DNS-replikáció közötti különbségtétel érdekében az utóbbi például arginin-hiányos tápoldattal, alacsony szérumtartalommal vagy a tápoldathoz adott hidroxi-karbamiddal gátolható.

Az UDS folyadékszcintillációval történő (LSC) mérése: A vizsgált anyaggal való kezelést megelőzően a sejtek S fázisba lépését a fent leírtak szerint kell gátolni; majd az autoradiográfiás módszernél leírtak szerint kell a sejteket kezelni a vizsgált anyaggal. Az inkubációs idő végén a DNS-t kivonják a sejtekből, és meghatározzák a teljes DNS-tartalmat, illetve a ^{3}H-TdR-beépülés mértékét.

Megjegyzendő, hogy a fenti technikák során – ha emberi limfocitákat használnak – a nem stimulált tenyészetekben a félig konzervatív DNS-replikáció gátlása szükségtelen.

Elemzés

Autoradiográfiás meghatározások

Az UDS-nek a sejttenyészetben való meghatározásához az S-fázisú magokat nem kell számításba venni. Koncentrációnként legalább 50 sejtet számolnak. A tárgylemezeket számlálás előtt kóddal látják el. Minden lemezen több, véletlenszerűen választott, egymástól távol eső látóteret számolnak meg. A ^{3}H-TdR beépülését a citoplazmába úgy határozzák meg, hogy minden megszámolt sejtben három, sejtmag nagyságú citoplazma-látóteret számolnak meg.

LSC módszerrel végzett meghatározások

Az LSC-vel végzett UDS-meghatározások során minden koncentráció és kontroll esetében megfelelő mennyiségű tenyészetet használnak fel.

Valamennyi eredményt független vizsgálatokkal kell megerősíteni.

2. ADATOK

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni.

2.1. Autoradiográfiás meghatározások

A citoplazmában megfigyelhető ^{3}H-TdR beépülés mértékét és a sejtmag felett található szemcsék számát külön kell feljegyezni.

Átlagos, közepes és modulált értéket használhatunk a ^{3}H-TdR-citoplazma eloszlási mértékének, valamint a magonként látható szemcsék számának jellemzésére.

2.2. LSC módszerrel végzett meghatározások

Az LSC-módszerrel végzett meghatározások esetén a ^{3}H-TdR-beépülést dpm/µg DNS-ben fejezzük ki. Az átlagos dpm/µg DNS-érték a normál szórással együtt felhasználható a beépülés eloszlásának leírására.

Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni.

3. ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– a felhasznált sejtek, a sejtek sűrűsége és a passzálások száma kezeléskor, a sejtkultúrák száma,

– a sejtkultúrák fenntartásához használt módszerek: tápfolyadékok, hőmérséklet, szén-dioxid-koncentráció,

– a vizsgált anyag, a vivőanyag, koncentrációik és a vizsgálathoz használt koncentrációk indokolása,

– a felhasznált metabolikus aktiválórendszerrel kapcsolatos adatok,

– a kezelési protokoll,

– a pozitív és a negatív kontrollok,

– a használt autoradiográfiás eljárás,
– a sejtek S fázisba lépésének megakadályozására használt eljárások,
– a DNS kivonására és a teljes DNS-tartalom meghatározására használt eljárások az LSC technika során,
– a dózis-hatás összefüggés, ha lehetséges,
– az eredmények statisztikai feldolgozása,
– az eredmények megvitatása,
– az eredmények értelmezése.

3.2. **Értékelés és értelmezés**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

IN VITRO EMLŐSSEJTTESTVÉRKROMATIDKICSERÉLŐDÉS- (SISTER CHROMATID EXCHANGE, SCE) VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. Referenciaanyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A testvérkromatidcsere- (SCE = Sister Chromatid Exchange) vizsgálat a megkettőződő kromoszóma két testvérkromoszóma-állománya (kromatidja) közötti reciprok DNS-csere kimutatására szolgáló, rövid távú módszer. Az SCE technika gyakorlatilag homológ lokuszok közötti DNS-replikációs termékek cseréjét jelenti. A csere feltehetően a DNS-lánc eltörését és újbóli összeforrását is magában foglalja, bár a jelenség molekuláris háttere kevéssé ismert. Az SCE jelenségének észleléséhez a testvérkromoszóma-állományok eltérő jelölésére van szükség, amely úgy valósítható meg, hogy két sejtcikluson át bróm-dezoxi-uridint (BrdU) építenek be a kromoszomális DNS-molekulába.

Az emlőssejteket *in vitro*, metabolikus aktiválórendszer jelenlétében, illetve a nélkül kezelik a vizsgált anyaggal, amennyiben ez megfelelő, majd a sejteket két replikációs cikluson keresztül tenyésztik BrdU-t tartalmazó tápoldatban. Az orsóképződést gátló anyaggal való kezelést (pl. kolchicin) követően, amely azt a célt szolgálja, hogy a sejteket a mitózisnak egy metafázisszerű szakaszában (c-metafázis) gyűjtse össze, a sejteket összegyűjtik, és kromoszómakészítményeket állítanak elő.

1.5. Minőségi követelmények

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

Előkészületek

– A vizsgálathoz primer tenyészetek (emberi limfociták) vagy stabil sejtvonalak (pl. kínaihörcsögpetefészek-sejtek) használhatók. A sejtvonalakat ellenőrizzük *Mycoplasma*-szennyeződés szempontjából.

– Megfelelő tápoldatot és inkubációs feltételeket (pl. hőmérséklet, tenyésztőedény, CO_2-koncentráció, páratartalom) kell biztosítani.

– A vizsgált anyagot tápoldatban készítik el, vagy a sejtek kezelését megelőzően a megfelelő vivőanyagban oldják, illetve szuszpendálják. A vivőanyag végleges koncentrációja a tápközegben nem befolyásolhatja jelentős mértékben a sejtek életképességét, illetve szaporodását, az SCE gyakoriságára gyakorolt hatását pedig oldószeres kontrollal kell ellenőrizni.

– A sejteket a vizsgált vegyület hatásának megfelelő anyagcsere-aktiváló rendszer jelenlétében és hiányában egyaránt ki kell tenni. A másik lehetőség, hogy belső metabolikus aktivitással rendelkező sejttípusokat használnak, ám ilyenkor az aktivitás jellegét és mértékét ismerni kell, hogy az megfeleljen a vizsgált kémiai osztálynak.

Vizsgálati körülmények

Kultúrák száma

Minden vizsgálati ponthoz legalább két kultúrát kell használni.

Pozitív és negatív kontrollok használata

Minden vizsgálatnak pozitív kontrollként tartalmaznia kell egy közvetlenül ható vegyületet és egy metabolikus aktiválást igénylő vegyületet is; ezenkívül negatív (vivőanyag-) kontrollt is kell használni.

Néhány példa a pozitív kontrollként felhasználható anyagokra:

– közvetlenül ható vegyületek:

  – etil-metán-szulfonát,

– közvetve ható vegyületek:

  – ciklofoszfamid.

Ahol szükséges, alkalmazni lehet még egy pozitív kontrollt is, amely a vizsgált anyaggal egyező vegyületosztályba tartozik.

Expozíciós koncentrációk

A vizsgált anyagnak legalább három, egyenletesen elosztott koncentrációját kell alkalmazni. A legnagyobb vizsgált koncentrációnak jelentős toxikus hatást kell kiváltania, de ezzel együtt megfelelő mértékű sejtosztódást kell lehetővé tennie. Vízben viszonylag rosszul oldódó anyagokat a megfelelő eljárások alkalmazásával oldhatóságuk határáig kell vizsgálni. A vízben jól oldódó és nem mérgező anyagok felső koncentrációját esetenként kell meghatározni.

A kísérlet végrehajtása

Sejttenyészetek készítése

Stabil sejtvonalakat hoznak létre törzstenyészetekből (például tripszines emésztéssel vagy rázással), ezeket megfelelő sűrűségben tenyésztőedényekbe teszik át, és 37 °C-on inkubálják. Egy sejtrétegű (monolayer) kultúrákhoz a tenyésztőedényenkénti sejtszámot úgy kell beállítani, hogy a tenyésztési időszak végén (az összegyűjtéskor) a sejtréteg folyamatossága ne haladja meg jelentősen az 50 %-os arányt. A sejteket másik lehetőségként szuszpenziós tenyészetben is tarthatják. Az emberi limfocitatenyészeteket heparinnal kezelt vérből állítják elő a megfelelő technikával, és 37 °C-on inkubálják.

Kezelés

Az exponenciális osztódási szakaszban lévő sejteket a vizsgált anyaggal megfelelő időn keresztül kezelik; a legtöbb esetben egy vagy két óra elegendő, de a kezelés bizonyos esetekben meg is hosszabbítható két teljes sejtciklus erejéig. A megfelelő szintű saját metabolikus aktivitással nem rendelkező sejteket a vizsgált anyaggal a megfelelő metabolikus aktiválórendszer jelenlétében, illetve a nélkül is kezelni kell. A kezelés végén a sejtek környezetéből kimossák a vizsgált anyagot, majd BrdU jelenlétében két replikációs cikluson keresztül folytatják a tenyésztést. A kezelés másik lehetősége, hogy a sejteket két teljes sejtcikluson át egyszerre kezeljük a vizsgált anyaggal és a BrdU-val.

Az emberi limfocitatenyészeteket akkor kezelik, amikor azok félszinkron állapotban vannak.

A sejtek elemzésére a kezelést követő második osztódáskor kerül sor, így biztosítják, hogy a legérzékenyebb osztódási szakaszok során fejthesse ki a vegyi anyag a hatását. Minden olyan sejttenyészetet, amelyhez BrdU-t adtunk, sötétben vagy tompa fénynél kell tartani a tenyésztési időszak végéig, hogy csökkentsük a BrdU-t tartalmazó DNS fotolízisét.

A sejtek összegyűjtése

A tenyészeteket egy–négy órával a sejtek összegyűjtése előtt orsóképződést gátló vegyülettel (pl. kolchicinnel) kezeljük. Valamennyi tenyészetet külön-külön gyűjtjük be és dolgozzuk fel a kromoszómapreparáláshoz.

Kromoszóma-előkészítés és -festés

A kromoszómakészítményeket standard citogenetikai módszerekkel állítják elő. A lemezek megfestése az SCE-jelenség kimutatására többféle technikával is elvégezhető (pl. fluoreszcens és Giemsa-festés).

Elemzés

Az elemzett sejtek számát az SCE-jelenség spontán gyakorisága alapján kell meghatározni. Rendszerint minden tenyészetből legalább 25, jól szétterült metafázist elemeznek az SCE-k szempontjából. Az elemzéshez a tárgylemezeket kóddal látják el. Az emberi limfocitákban csak a 46 centromert tartalmazó metafázisokat elemezzük. Stabil sejtvonalak esetében csak a modális szám ± 2 centromert tartalmazó metafázisokat elemeznek. Fel kell tüntetni, hogy a jelzés centromerikus váltását SCE-nek vesszük-e, vagy sem. Az eredményeket további független vizsgálattal kell megerősíteni.

2. ADATOK

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni. Az SCE-k számát metafázisonként és az egyes metafázisokban kimutatható SCE-k számát kromoszómánként minden kezelt és kontrolltenyészet esetében külön meg kell adni.

Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni.

3. ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– a felhasznált sejtek, sejtkultúrák fenntartásának módszere,

– a vizsgálat körülményei: a tápoldatok összetétele, a szén-dioxid-koncentráció, a vizsgált anyag koncentrációja, a felhasznált vivőanyag, az inkubációs hőmérséklet, a kezelés időtartama, a felhasznált orsóképződést gátló vegyület, annak koncentrációja és az azzal történő kezelés időtartama, a felhasznált aktiválórendszer, a pozitív és a negatív kontrollok,

– a sejtkultúrák száma vizsgálati pontonként,

– a lemezkészítéshez használt technika részletes leírása,

– az elemzett metafázisok száma (az adatokat külön kell megadni minden sejtkultúrára),

– az SCE átlagos száma sejtenként és kromoszómánként (az adatokat külön kell megadni minden sejtkultúrára),

– az SCE-számolás/besorolás kritériumai,

– a dózisok megválasztásának indokai,

– a dózis-hatás összefüggés, ha van,

– az eredmények statisztikai feldolgozása, ahol lehetséges,

– az eredmények megvitatása,

– az eredmények értelmezése.

3.2. Értékelés és értelmezés

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

NEMHEZ KÖTÖTT RECESSZÍV LETÁLIS VIZSGÁLAT *DROSOPHILA MELANOGASTER*BEN

1. **MÓDSZER**

1.1. **Bevezetés**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. **Fogalommeghatározások**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. **Referenciaanyagok**

Nincsenek.

1.4. **A vizsgálati módszer elve**

A nemhez kötött, recesszív letális (SLRL Test = sex-linked recessive lethal test) vizsgálat *Drosophila melanogaster* használatával mutációk jelenlétét – pont mutációkat vagy kisebb törléseket – mutatja ki a rovar csíravonalában. A vizsgálattal az előrehaladó mutáció követhető, és az X kromoszóma mintegy 800 lokuszán van lehetőség a mutációk szűrésére; ez az X-kromoszóma összes lokuszának mintegy 80 %-át jelenti. Az X kromoszóma pedig a teljes haploid genom mintegy egyötödét képviseli.

A *Drosophila melanogaster* X-kromoszómájának mutációi fenotípusosan a mutáns gént hordozó hímeken jelennek meg. Ha valamely mutáció hemizigóta állapotban halálos, annak jelenlétére a heterozigóta nőstények által normál esetben kiköltött két hím osztály egyikének hiánya utal. Az SLRL-vizsgálattal különleges módon megjelölt és elrendezett kromoszómák segítségével fel lehet ismerni az említett sajátosságokat.

1.5. **Minőségi követelmények**

Nincsenek.

1.6. **A vizsgálati módszer leírása**

Előkészületek

Törzsek

Jól jellemzett, vad típusú törzshöz tartozó hímek és a Muller-5 elnevezésű törzsből származó nőstények használhatók. Más, megfelelően jelölt nőstény törzsek is használhatók, ha van többszörös inverz X-kromoszómájuk.

Vizsgált anyag

A vizsgált anyagokat vízben oldják. A vízben nem oldódó anyagokat a megfelelő vivőanyagban is lehet oldani vagy szuszpendálni (pl. etanol és Tween-60, illetve Tween-80 keverékében), majd vízzel, illetve sóoldattal hígítani a beadás előtt. A dimetil-szulfoxidot (DMSO) lehetőleg ne használják vivőanyagként.

Az állatok száma

A vizsgálatot előre meghatározott érzékenységgel és felbontóképességgel kell megtervezni. A megfelelő kontrollban megfigyelt spontán mutációs gyakoriság jelentősen befolyásolja az elemzésre szánt kezelt kromoszómák számát.

Az adagolás módja

Az anyagot szájon át, injekcióval, illetve gázzal vagy párával való expozíció útján adagolhatjuk. A vizsgált anyagot táplálékként cukoroldatban adhatók be. Szükség esetén az anyagokat 0,7 %-os NaCl-oldatban is feloldhatjuk, és azt a mellkasba vagy a hasüregbe fecskendezhetjük.

Negatív és pozitív kontrollok alkalmazása

Negatív (vivőanyag-) és pozitív kontrollokat is alkalmazni kell. Ha azonban megfelelő történeti laboratóriumi adatok állnak rendelkezésre, kontrollokra nincs szükség.

Expozíciós szintek

Három expozíciós szintet kell alkalmazni. Előzetes felmérésre a vizsgált anyag egyetlen koncentrációját használják, ez lehet a legnagyobb elviselhető koncentráció, vagy pedig az, amely a toxicitás bizonyos jeleit kiváltja. A nem mérgező anyagoknál a legnagyobb, gyakorlatilag még megvalósítható koncentrációt használják.

A kísérlet végrehajtása

A vizsgált anyaggal vad típusú (három-öt napos) hímeket kezelnek, majd egyenként pároztatják a Muller-5 törzsből vagy más, megfelelően jelölt törzsből származó szűz nőstényekkel (a törzsekben többszörös inverz X-kromoszómának kell lennie). A nőstényeket két-háromnaponta friss szűz állatokra cserélik le, hogy a teljes csírasejtciklust le tudják fedni. E nőstények utódait megvizsgálják a halálos hatások szempontjából, amelyek megnyilvánulhatnak a kezelés alatt az érett spermára, a középső szakaszban és a kései stádiumban lévő spermatidákra, a korai spermatidákra, illetve az elősejtekre és az ős-ondósejtekre gyakorolt hatásban.

A fenti keresztezésekből származó heterozigóta F_1 nőstényeket engedik egyedenként párzani (vagyis csoportonként egy nőstényt) a testvéreikkel. Az F_2 nemzedékben minden tenyészetben meghatározzák a vad típusú hímek hiányát. Ha egy tenyészet minden jel szerint a szülői X-kromoszómában a halálos gént hordozó F_1 nősténytől származik (vagyis egyetlen hímet sem találtak a kezelt kromoszómával), annak a nősténynek az azonos genotípusú leányait is vizsgálni kell annak bizonyítására, hogy a letalitás megismétlődik-e a következő generációban.

2. ADATOK

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni a vizsgált X-kromoszómák, a terméketlen hímek, valamint a halálos kromoszómák számának az egyes adagolási koncentrációknál, illetve párosítási időszakoknál az egyes kezelt hímekre történő bemutatásához. A hímenként észlelhető eltérő nagyságú csoportok (klaszterek) számát rögzíteni kell. Ezen eredményeket külön vizsgálattal is meg kell erősíteni.

Megfelelő statisztikai módszerek alkalmazásával kell értékelni a nemhez kötött, recesszív halálos mutációs vizsgálatokat. Az egy hímtől eredő recesszív letális mutációk csoportjait a megfelelő statisztikai módszerekkel kell vizsgálni és értékelni.

3. ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– törzs: a használt *Drosophila* törzsek és fajták, a rovarok kora, a kezelt hímek száma, a steril hímek száma, a létrejött F_2 tenyészetek száma, a leszármazottak nélküli F_2 tenyészetek száma, az egyes csírasejtstádiumokban észlelt, halálos génmutációt hordozó kromoszómák száma,

– a kezelt csoportok méretének meghatározásához használt kritériumok,

– a vizsgálati feltételek: a kezelési és a mintavételi ütemterv részletes ismertetése, az expozíciós szintek, a toxicitási adatok, a negatív (oldószeres) és a pozitív kontrollok, ha szükséges,

– a letális mutációk számlálásának kritériumai,

– dózis-hatás összefüggés, ha van

– az eredmények statisztikai feldolgozása,

– az eredmények megvitatása,

– az eredmények értelmezése.

3.2. Értékelés és értelmezés

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

IN VITRO EMLŐSSEJT-transzformációs VIZSGÁLATOK

1. **MÓDSZER**

1.1. **Bevezetés**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. **Fogalommeghatározások**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. **Referenciaanyagok**

Nincsenek.

1.4. **A vizsgálati módszer elve**

Az emlőssejtkultúra-rendszerek felhasználhatók a rosszindulatú *in vivo* átalakulással összefüggésbe hozott kémiai vegyületek által kiváltott *in vitro* fenotípusos változások kimutatására. A széles körben alkalmazott sejtvonalak közé tartozik a C3H10T$^{1}/_{2}$, a 3T3, az SHE, a Fischer jelzésű patkánysejtvonal; a vizsgálatok a sejtek morfológiai változásain, fókuszképződésén vagy félszilárd agaron való megtelepedésiképesség-változásain alapulnak. Kevésbé széles körben használt rendszerek is léteznek, amelyek más fiziológiai vagy morfológiai változásokat mutatnak ki a sejtekben, a rákkeltő anyagokkal történő kezelést követően. Az *in vitro* vizsgálatok egyetlen végpontja esetében sem bizonyított az a mechanizmus, amely a hatás és a karcinogén folyamat összefüggését magyarázza. Egyes vizsgálati rendszerek alkalmasak tumorpromoterek kimutatására. A citotoxicitást a vizsgált anyagnak a kolóniaképző képességre (klónozási hatékonyság) vagy a kultúrák növekedési sebességére gyakorolt hatásával határozhatják meg. A citotoxicitás mérése azt a célt szolgálja, hogy megállapítsák, a vizsgált anyag adagja toxikológiailag releváns volt-e, de nem használható minden mérésnél a transzformációs gyakoriság kiszámítására, hiszen egyes vizsgálatok esetében hosszabb inkubációra és/vagy ismételt szélesztésre van szükség.

1.5. **Minőségi követelmények**

Nincsenek.

1.6. **A vizsgálati módszer leírása**

Előkészületek

Sejtek

Az alkalmazott transzformációs vizsgálattól függően számos sejtvonal vagy primer sejttenyészet jöhet szóba. A vizsgálatot végző személynek biztosítania kell, hogy az elvégzendő vizsgálat során a megfelelő fenotípusos változás következik be az ismert rákkeltő hatású anyaggal való expozíciót követően, és hogy a vizsgálatot végző személy által vezetett kutatólaboratóriumban végzett vizsgálat megbízhatósága és érvényessége bizonyított és dokumentálható.

Tápfolyadék

Olyan tápfolyadékot és vizsgálati körülményeket kell alkalmazni, amelyek a legjobban illenek a használt transzformációs vizsgálathoz.

Vizsgált anyag

A vizsgált anyagokat a sejtek kezelését megelőzően tápfolyadékban vagy megfelelő vivőanyagban kell előkészíteni vagy feloldani, illetve szuszpendálni. A vivőanyag végső koncentrációja a kultúrában nem befolyásolhatja a sejtek életképességét, növekedési sebességét vagy a transzformáció előfordulási gyakoriságát.

Anyagcsere-aktiválás

A sejteket a vizsgált vegyület hatásának megfelelő anyagcsere-aktiváló rendszer jelenlétében és hiányában egyaránt ki kell tenni. A másik lehetőség, hogy belső metabolikus aktivitással rendelkező sejttípusokat használunk, ám ilyenkor az aktivitás jellegét és mértékét ismerni kell, hogy az megfeleljen a vizsgált kémiai osztálynak.

Vizsgálati körülmények

Pozitív és negatív kontrollok használata

Minden vizsgálatnak pozitív kontrollként tartalmaznia kell egy közvetlenül ható vegyületet és egy metabolikus aktiválást igénylő vegyületet is; ezenkívül negatív (vivőanyag-) kontrollt is kell használni.

Néhány példa a pozitív kontrollként felhasználható anyagokra:

– közvetlenül ható vegyületek:

  – etil-metán-szulfonát,

  – béta-propiolakton,

– közvetve ható vegyületek:

  – 2-acetoamin-fluorén,

  – 4-dimetil-amino-azo-benzén,

  – 7,12-dimetil-benzantracén.

Ahol szükséges, alkalmazni lehet még egy pozitív kontrollt is, amely a vizsgált anyaggal egyező vegyületosztályba tartozik.

Expozíciós koncentráció

A vizsgált anyag több koncentrációját kell alkalmazni. E mennyiségeknek koncentrációfüggő mérgező hatást kell eredményezniük, amelyek jellemzője, hogy a legnagyobb vizsgált koncentrációval alacsony túlélési arány jár, míg a legalacsonyabb koncentrációval kezelt csoportban a túlélés megközelítőleg megegyezik a negatív kontrollcsoportéval. Vízben viszonylag rosszul oldódó anyagokat a megfelelő eljárások alkalmazásával oldhatóságuk határáig szükséges vizsgálni. A vízben jól oldódó és nem mérgező anyagok felső koncentrációját esetenként kell meghatározni.

A kísérlet végrehajtása

A sejteket a felhasznált vizsgálati rendszer függvényében megfelelő ideig kezelik az anyaggal, ami adott esetben a tápfolyadék cseréjét követő ismételt adagolást jelenthet (és szükség esetén friss anyagcsere-aktiváló keveréket), hosszabb expozíció esetében. A szükséges belső metabolikus aktivitással nem rendelkező sejteket a megfelelő metabolikus aktiválórendszer jelenlétében, illetve hiányában is kezelni kell a vizsgált anyaggal. A kezelés végén a sejtek környezetéből kimossák az anyagot, és olyan, megfelelő körülmények között tenyésztik, amelyek mellett a vizsgált, transzformált fenotípus megjelenhet, és a transzformáció előfordulási gyakorisága meghatározható. Valamennyi eredményt független vizsgálattal kell megerősíteni.

2. ADATOK

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, amely számos fajtát jelenthet attól függően, hogy milyen meghatározást végzünk, pl. telepszám, pozitív telepek, illetve a transzformált sejtek száma. Ahol szükséges, a túlélési arányt a kontrollértékek százalékában, a transzformációs gyakoriságot pedig a túlélő sejtekre eső transzformált sejtek számának arányában kell megadni. Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni.

3. ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– a felhasznált sejttípus, a sejtkultúrák száma, a sejtkultúrák fenntartásának módszere,

– a vizsgálat körülményei: a vizsgált anyag koncentrációja, a felhasznált vivőanyag, az inkubációs idő, a kezelés gyakorisága és időtartama, a sejtsűrűség a kezelés alatt, a felhasznált külső anyagcsere-aktiváló rendszer, a pozitív és negatív kontrollok, a megfigyelt fenotípus leírása, a használt szelektív rendszer (ha alkalmazható), a dózisok megválasztásának indokolása,

– az életképes és transzformált sejtek megszámlálásához használt módszer,
– az eredmények statisztikai feldolgozása,
– az eredmények megvitatása,
– az eredmények értelmezése.

3.2. **Értékelés és értelmezés**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

DOMINÁNS LETÁLIS VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓKON

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. Referenciaanyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A domináns letális (halálos) hatások embrionális, illetve magzati elhalást okoznak. A domináns letális hatások indukálása azt jelzi, hogy az illető vizsgált anyag a vizsgált állatfaj esetében hatást gyakorolt a csíraszövetekre. Az általánosan elfogadott nézet szerint a domináns letális hatások kromoszómakárosodásra vezethetők vissza (szerkezeti és számbeli rendellenességek). Nőstény állatok kezelése esetén az embrió elpusztulása az anyag toxikus hatása miatt is bekövetkezhet.

Általában hím állatokat kezelnek a vizsgált anyaggal, és a kezelt állatokat kezeletlen szűz nőstényekkel pároztatják. A különféle csírasejtstádiumok külön vizsgálhatók, ha egymás után következő pároztatási időközöket alkalmazunk. Az egy nőstényre jutó élettelen, beágyazódott embriók számának növekedése a kezelt csoportban a kontrollcsoportban tapasztalható hasonló adathoz képest a beágyazódás utáni veszteséget tükrözi. A beágyazódás előtti veszteségeket a sárgatestek száma alapján vagy a kezelt és kontrollcsoportokban az összes beágyazódott embriók számának összehasonlításából lehet kiszámítani. Az összes domináns letális hatás a beágyazódás előtti és utáni elhalás összegéből adódik. Az összes domináns letális hatás kiszámítása a kezelt csoportban az egy nőstényre jutó élő, beágyazódott embriók számának a kontrollcsoportban egy nőstényre jutó, élő beágyazódott embriók számával történő egybevetésén alapul. A beágyazódott embriók számának csökkenése bizonyos időközönként sejtpusztulás eredménye is lehet (azaz spermatociták és/vagy ondósejt-előalakok pusztulásáé).

1.5. Minőségi követelmények

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

Előkészületek

Ahol lehet, a vizsgált anyagokat izotóniás sóoldatban kell feloldani vagy szuszpendálni. A vízben oldhatatlan vegyi anyagokat a megfelelő vivőanyagban lehet feloldani vagy szuszpendálni. Az alkalmazott vivőanyag nem lehet hatással a vizsgált anyagra, és nem okozhat toxikus hatást. A vizsgált vegyi anyag friss készítményeit kell használni.

Vizsgálati körülmények

Az adagolás módja

A vizsgált vegyületet rendszerint csak egyszer kell beadni. Toxikológiai információk alapján ismételt kezelés is lehetséges. Az általánosan alkalmazott adagolási módok a szájon át történő intubálás és az intraperitoneális injekció. Más alkalmazási módok is megfelelőek lehetnek.

A kísérlethez felhasznált állatok

A javasolt kísérleti állat a patkány vagy az egér. Az egészséges, ivarérett állatokat véletlenszerű kiválasztással kezelt és kontrollcsoportokba kell beosztani.

Az állatok száma és neme

Megfelelő létszámban kell kezelt hímeket felhasználni, figyelembe véve az értékelni kívánt biológiai jellemző spontán variációit. A létszám meghatározása során a kimutatás korábban már meghatározott érzékenységi szintjét és a szignifikancia mértékét kell alapul venni. Egy tipikus vizsgálatban például minden adagolási csoportban a hímek számának elegendőnek kell lennie ahhoz, hogy minden párzási időszakban 30 és 50 közötti nősténynél alakuljon ki vemhesség.

Negatív és pozitív kontrollok alkalmazása

Minden vizsgálatban negatív (vivőanyag-) és pozitív kontrollokat is kell alkalmazni. Ha azonban elfogadható pozitív kontrolleredmények állnak rendelkezésre ugyanazon laboratóriumban nemrégiben elvégzett vizsgálatokból, ezeket fel lehet használni az egyidejű kontrollok alkalmazása helyett. A pozitív kontrollanyagokat csak megfelelően alacsony dózisban lehet alkalmazni (pl. MMS, intraperitoneálisan, 10 mg/kilogramm dózisban) a vizsgálat érzékenységének kimutatására.

Adagolási szintek (dózis)

Rendszerint három adagolási szintet (dózis) alkalmazunk. A nagy dózisnak toxikus tüneteket vagy csökkent termékenységet kell okoznia a kezelt állatokon. Egyes esetekben egyetlen nagy dózis is elegendő lehet.

Határérték-vizsgálat

A nem mérgező anyagokat egyszeri beadással 5 gramm/kg mennyiségben vagy ismételt beadással 1 gramm/kg/nap dózisban kell adagolni.

A kísérlet végrehajtása

Számos kezelési protokoll áll rendelkezésre. A leginkább elterjedt módszer a vizsgált anyag egyszeri beadása. Más kezelési protokoll is alkalmazható.

A kezelést követően minden egyes hímet megfelelő időközönként egymás után egy vagy két kezeletlen szűz nősténnyel pároztatnak. A nőstényeket legalább egy ivarzási ciklus erejéig a hímekkel kell tartani, illetve addig, amíg a párzásra sor nem került, ami a hüvelyben a sperma jelenlétéből, illetve a hüvelyi dugó megjelenéséből határozható meg.

A kezelést követő párzások számát a kezelési protokoll határozza meg, és azt úgy kell kialakítani, hogy a kezelés után a csírasejtképződés összes fázisából lehessen mintát venni.

A nőstényeket a vemhesség második felében pusztítják el, és a méh tartalmát megvizsgálva megállapítják az élő és elhalt implantátumok számát. A petefészkek vizsgálatával meghatározható a sárgatestek száma.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, bemutatva a hímek számát, a vemhes nőstények számát, valamint a nem vemhes nőstények számát. Minden párzás eredményét egyedileg kell jegyzőkönyvezni, egyenként azonosítva a hímet és a nőstényt. Minden nőstény esetében fel kell jegyeznünk a párzás hetét, a hím állatnak beadott dózist és az élő és az elhalt implantátumok gyakoriságát.

A teljes domináns letális hatás kiszámítása a kezelt csoportban egy nőstényre jutó élő, beágyazódott embriók számának a kontrollcsoportban egy nőstényre jutó élő, beágyazódott embriók számával történő egybevetésén alapul. Az elhalt és az élettelen implantátumok arányát hasonlítjuk össze a kezelt és a kontrollcsoport között a beágyazódás utáni veszteség elemzése céljából.

Ha az adatokat korai és kései elhalásként értékelték, azt a táblázatokban világosan jelezni kell. Ha vizsgálták a beágyazódás előtti veszteséget is, akkor azt is jegyzőkönyvezni kell. A beágyazódás előtti veszteségeket a sárgatestek számának és az implantátumok számának eltéréséből vagy a méhenkénti átlagos implantátumszám fogyatkozásából számíthatják ki a kontrollpárzásokhoz viszonyítva.

Az eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni.

3. **ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. **Vizsgálati jelentés**

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– a kísérlethez felhasznált állatok fajtája, törzse, kora és súlya, mindkét nembeli állatok száma a vizsgálati és a kontrollcsoportokban,
– a vizsgált anyag, a vivőanyag, a vizsgált dózisok és azok kiválasztásának indokolása, a pozitív és a negatív kontrollok, a toxicitási adatok,
– az adagolás módja és a kezelés ütemezése,
– párzási ütemterv,
– a párzás igazolására használt módszer,
– az elpusztítás időpontja,
– a domináns letális mutációk számlálásának kritériumai,
– a dózis-hatás összefüggés, ha van,
– az eredmények statisztikai feldolgozása, ahol lehetséges,
– az eredmények megvitatása,
– az eredmények értelmezése.

3.2. **Értékelés és értelmezés**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

IN VIVO EMLŐSCSÍRASEJT-CITOGENETIKA

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. Referenciaanyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

Ez az *in vivo* citogenetikai vizsgálat az ős-ondósejtek (spermatogoniumok) szerkezeti jellegű kromoszóma-rendellenességeit mutatja ki. A módszer részét képezi a spermatogoniumok mitotikus osztódásának elemzése a kromatid- és a kromoszómatípusú rendellenességek szempontjából.

A módszer során olyan emlősök herepreparátumait alkalmazzák, amelyeket előzetesen a megfelelő módon kezeltek a vizsgált anyaggal; az állatokat különböző időközönként kell elpusztítani. Az állatokat az elpusztítás előtt orsóképződést gátló szerrel, például kolchicinnel kell kezelni, hogy a sejtek sejtciklusa a mitózis metafázishoz hasonló szakaszban (c-metafázis) álljon le. Levegőn szárított kromoszómapreparátumokat szükséges készíteni, és festés után mikroszkóppal vizsgálják azokat.

Értékes kiegészítő információt jelenthet, ha a spermatogonium sejtjeinek kezelését követően elvégzik a spermatociták elemzését polivalens transzlokációk szempontjából az I-es típusú diakinézis-metafázis alatt.

1.5. Minőségi követelmények

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

Előkészületek

Ahol lehet, a vizsgált anyagokat izotóniás sóoldatban kell feloldani vagy szuszpendálni. A vízben oldhatatlan vegyi anyagokat a megfelelő vivőanyagban lehet feloldani vagy szuszpendálni. A vizsgált vegyi anyag friss készítményeit kell használni. Az alkalmazott vivőanyag nem lehet hatással a vizsgált anyagra, és nem okozhat toxikus hatást.

Az adagolás módja

A vizsgált vegyületet rendszerint csak egyszer kell beadni. Toxikológiai információkra alapozva ismételt kezelési ütemterv is alkalmazható. Az ismételt kezelés azonban csak akkor alkalmazható, ha a vizsgált vegyület nem gyakorol jelentősebb mérgező hatást a differenciálódó spematogoniumokra.

Az általában alkalmazott adagolási módok az orális adagolás, illetve az intraperitoneális injekció. Más alkalmazási módok is megfelelőek lehetnek.

A kísérlethez felhasznált állatok

Leggyakrabban egeret és kínai hörcsögöt használnak. Bármely egyéb emlősfaj is alkalmazható.

Az egészséges, ivarérett hímeket véletlenszerű kiválasztással kezelt és kontrollcsoportokba osztják be.

Az állatok száma és neme

Vizsgálati és kontrollcsoportonként legalább öt hímet kell használni.

Negatív és pozitív kontrollok alkalmazása

Minden vizsgálathoz pozitív és negatív (vivőanyag-) kontrollt kell egyidejűleg használni.

A pozitív kontrollanyagokat csak a megfelelően alacsony dózisban lehet alkalmazni (pl. MMS, intraperitoneálisan, 0,3 mg/kilogramm dózisban) a vizsgálat érzékenységének kimutatására.

Adagolási szintek (dózisok)

A vizsgált anyag egyetlen dózisát alkalmazzák: vagy a legnagyobb még elviselhető dózist, vagy azt, amely bizonyos fokú citotoxikus hatást idéz elő. Ha a dózis túl sok sejtet pusztít el, akkor egy további, alacsonyabb dózist kell alkalmazni, amely mutat citotoxicitást. Ha a dózis-hatás összefüggés megismerése szükséges, akkor legalább három különböző dózist kell alkalmazni (pl. egy gyenge pozitív reakció megerősítéséhez). A nem toxikus anyagokat a lehető legnagyobb dózisban kell vizsgálni mind az egyszeri, mind a többszöri alkalmazáskor.

A kísérlet végrehajtása

Az állatokat általában csak egy alkalommal kezelik a vegyülettel. A legnagyobb dózissal kezelt csoportban a kezelés után három mintavételt végeznek. A második mintavételt 24 óra elteltével kell végezni. Mivel a vizsgált anyag befolyásolhatja a sejtciklus kinetikáját, egy korábbi és egy későbbi mintavételi időközt is beiktatnak, egyenletesen elosztva a kezelést követő 6 és 48 óra közötti időtartamban. További dózisok alkalmazása esetén a mintákat a különösen érzékeny periódusban kell venni, vagy ha az nem ismert, 24 órával a kezelés után.

Másik lehetőségként egy ismételt kezelési ütemterv is alkalmazható, ezen esetben az állatokat az utolsó kezelést követő 24 óra elteltével pusztítjuk el. A 6. és 24. óra közé további mintavételi időpontokat is be lehet iktatni.

Herepreparálás

A spematogoniumok mitózisainak vizsgálatára az állatokat intraperitoneális injekcióval beadott, orsóképződést gátló anyaggal, például kolchicinnel kezelik. Ezt követően, a megfelelő idő elteltével az állatokat elpusztítják. Egér esetében ez az időtartam három és öt óra között változhat, kínai hörcsög esetében több mint öt órára van szükség.

Levegőn szárított preparátumokat kell készíteni. A különböző fajok esetében módosításokra lehet szükség a standard eljárásban. Sejtszuszpenziót készítenek, azt hipotóniás oldattal kezelik, majd fixálják. A sejteket tárgylemezre szélesztik, és megfestik. A tárgylemezeket a mikroszkópos vizsgálat előtt kóddal látják el.

Elemzés

Legalább 100 jó minőségű, valamennyi centromert tartalmazó mitotikusmetafázis-kenetet vizsgálnak meg szerkezeti kromoszóma-rendellenességek szempontjából. Ezenkívül a lehetséges citotoxikus hatás értékeléséhez állatonként összesen 100 osztódó sejtet tartalmazó mintában meghatározhatják a spermaképző mitózisoknak az első és a második meiotikus metafázishoz viszonyított arányát is.

2. **ADATOK**

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni. Valamennyi kontroll- és kezelt állat tekintetében külön fel kell sorolni a rendellenességek valamennyi típusát. Mellékelni kell a megvizsgált teljes sejtszámot és csoportonként a talált rendellenes sejtek számát. Minden paraméterre meg kell adni az átlagértéket és a normál szórást is. Ha meghatározták a spermaképző mitózisoknak az első és a második meiotikus metafázishoz viszonyított arányát, azt táblázatos formában kell megadni minden vizsgálati és kontrollcsoportra.

Az adatokat megfelelő statisztikai módszerrel kell értékelni.

3. **ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS**

3.1. **Vizsgálati jelentés**

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– a hímek faja, törzse, kora és súlya,
– az állatok száma minden vizsgálati és kontrollcsoportban,
– a vizsgálati feltételek, a kezelés részletes leírása, a dózisok, az oldószerek, az alkalmazott orsóképződést gátló szer,
– a vizsgált sejtek száma állatonként, valamennyi csoportban,
– az aberrációk típusa és száma valamennyi kezelt és kontrollállatban,
– az eredmények statisztikai feldolgozása,
– az eredmények megvitatása,
– az eredmények értelmezése.

3.2. **Értékelés és értelmezés**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

EGÉRFOLT- (SPOT) TESZT

1. **MÓDSZER**

1.1. **Bevezetés**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. **Fogalommeghatározások**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. **Referenciaanyagok**

Nincsenek.

1.4. **A vizsgálati módszer elve**

Ez egy *in vivo* vizsgálat egéren, amelynek során fejlődő embriókat kezelnek a vizsgált vegyülettel. A fejlődő embrióban a célsejtek a melanoblasztok, a célgének pedig azok, amelyek a hátszőrzet pigmentációjáért felelősek. A fejlődő embriók több ilyen, a szőrszínt kódoló génre heterozigóták. Ha valamely pigmentsejt egy ilyen génjében mutáció következik be, vagy elvész a domináns allél (különböző genetikai események hatására), az utódsejtben a recesszív fenotípus jelenik meg, aminek az a következménye, hogy a születő egér szőrzete egy foltban eltérő színű lesz. Meghatározzák az ilyen foltokkal született mutáns egerek számát, és gyakoriságukat összehasonlítják a csak oldószerrel kezelt embriókból keletkező utódnemzedékben előforduló foltosodási gyakorisággal. Az egérfoltosodási vizsgálat a magzati sejtek feltételezett szomatikus mutációinak kimutatására alkalmas.

1.5. **Minőségi követelmények**

Nincsenek.

1.6. **A vizsgálati módszer leírása**

Előkészületek

Ahol lehet, a vizsgált anyagokat izotóniás sóoldatban kell feloldani vagy szuszpendálni. A vízben oldhatatlan vegyi anyagokat a megfelelő vivőanyagban lehet feloldani vagy szuszpendálni. Az alkalmazott vivőanyag nem lehet hatással a vizsgált anyagra, és nem okozhat toxikus hatást. A vizsgált vegyi anyag friss készítményeit kell használni.

A kísérlethez felhasznált állatok

A T törzshöz tartozó (nonagouti, a/a; csincsilla, rózsaszín szemű, $c^{ch}p/c^{ch}p$; barna, b/b; halvány, rövid fülű, d se/d se; tarka foltos, s/s) egereket vagy a HT törzshöz tartozó egerekkel (halvány, nonagouti, rövid lábú, pa a bp/pa a bp; szürke pihés, ln fz/ln fz; gyöngy pe/pe) vagy a C57 BL (nonagouti, a/a) törzshöz tartozó egerekkel párosztatnak. Más megfelelő keresztezés, például az NMRI (nonagouti, a/a; albínó, c/c) és a DBA (nonagouti, a/a; barna, b/b; halvány d/d) törzsek között is használható, ha nonagouti utódaik lesznek.

Az állatok száma és neme

Megfelelő számú vemhes nőstényt kezelnek, hogy elegendő túlélő utód legyen minden dózishoz. A minta nagyságát a kezelt egereken megfigyelt foltok száma és a kontrolladatok nagyságrendje határozza meg. A negatív eredmény csak akkor fogadható el, ha a legnagyobb dózissal kezelt csoport nőstényeitől származó legalább 300 utódot vizsgáltak meg.

Negatív és pozitív kontrollok alkalmazása

Olyan egyidejűleg alkalmazott kontroll-egércsoport adatainak is rendelkezésre kell állniuk, amelyeket csak vivőanyaggal (negatív kontroll) kezeltek. A vizsgálat érzékenységének növelése érdekében az ugyanazon laboratóriumból származó történeti kontrolladatokat lehet összesíteni, ha azok homogének. Ha az aktuális vizsgálat nem mutatott ki mutagenitást a vizsgált anyagra, olyan pozitív kontrollvizsgálat eredményeinek kell rendelkezésre állniuk, amelyet nemrégiben végeztek ugyanazon laboratóriumban valamely ismert, mutagén hatású vegyülettel.

Az adagolás módja

Általánosan alkalmazott módszer a vemhes nőstények szájon át történő intubálása vagy az intraperitoneális injekció. Belélegeztetés vagy egyéb módszer is alkalmazható, ha szükséges.

Adagolási szintek (dózisok)

Legalább két adagolási szintet kell alkalmazni, amelyek közül az egyik toxikus tüneteket okoz, vagy csökkentett alomszámot eredményez. A nem mérgező anyagoknál a gyakorlatban kivitelezhető legnagyobb dózist kell használni.

A kísérlet végrehajtása

A vemhesség 8., 9., illetve 10. napján egyszeri dózist adnak, a vemhesség első napjának a hüvelyi dugó megjelenését tekintve. E napok a fogamzás utáni 7,25., 8,25. és 9,25. napnak felelnek meg. Az említett napokat követően is alkalmazható további kezelés.

Elemzés

Az utódokat kóddal látják el, és a születés utáni harmadik és negyedik hét között megszámolják foltjaikat. Háromfajta foltot különböztetnek meg:

a) fehér foltok a hasfal középvonalától számított 5 mm-en belül, amelyek feltehetőleg a sejtpusztulás következményei (WMVS);

b) sárga, agouti-szerű foltokat az emlők, a nemi szervek, a torok, a váll és a lágyék területein, valamint a homlokon, amelyek valószínűleg a hibás differenciáció (MDS) következményei; és

c) pigmentált és fehér foltokat véletlenszerűen elszórtan a szőrzeten, amelyek valószínűleg szomatikus mutáció (RS) következményei.

Mindhárom csoportban megszámolják a foltokat, de genetikai szempontból csak az utolsó, az RS játszik szerepet. Az MDS és az RS közötti különbségtételnél problémás esetekben a szőrminta fluoreszcens mikroszkóp alatti vizsgálata dönt.

Az utódok nyilvánvaló makroszkópos morfológiai rendellenességeit fel kell jegyezni.

2. ADATOK

Az adatokat feltüntetésekor meg kell adni az összes vizsgált utód és az egy vagy több vélt szomatikus mutációs foltot mutató egyedek számát. A kezelt és a negatív kontrollcsoportok adatait összevetik megfelelő statisztikai módszerek alkalmazásával. Az adatokat almonként is megadják.

3. ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– a keresztezéshez használt törzsek,

– a vemhes nőstények száma a vizsgálati és a kontrollcsoportokban,

– az átlagos alomszám a vizsgálati és a kontrollcsoportokban születéskor és a szoptatástól való elválasztáskor,

– a vizsgált anyag dózisa(i),

– a felhasznált oldószer,

– a vemhesség napja, amikor a nőstény megkapta a kezelést,
– az anyag adagolásának módja,
– az összes utód száma, a WMVS, MDS és RS típusú eltérésekkel rendelkező utódok száma a vizsgálati és a kontrollcsoportban,
– jelentős morfológiai rendellenességek,
– az RS-eltéréssel rendelkező állatok dózis-hatás összefüggései, ha lehetséges,
– az eredmények statisztikai feldolgozása, ahol lehetséges,
– az eredmények megvitatása,
– az eredmények értelmezése.

3.2. **Értékelés és értelmezés**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

EGÉREN VÉGZETT ÖRÖKLETES TRANSZLOKÁCIÓs VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.2. Fogalommeghatározások

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

1.3. Referenciaanyagok

Nincsenek.

1.4. A vizsgálati módszer elve

Az egéren végzett örökletes transzlokációs vizsgálat az első utódnemzedékből kinyerhető szerkezeti és számbeli kromoszómaváltozásokat mutatja ki. A kimutatott kromoszómaváltozások típusai a reciprok transzlokáció és – ha nőstény utódokat is vizsgálunk – az X-kromoszóma-veszteség. A transzlokáció-hordozók és az XO-nőstények csökkent termékenységgel rendelkeznek, ezen állatokat az F_1 utódnemzedékből ennek alapján válogatjuk ki a citogenetikai elemzéshez. Bizonyos transzlokáció-típusok teljes sterilitást eredményeznek (X-autoszóma és c-t típus). A transzlokációk citogenetikai vizsgálattal hím állatok (vagy F_1 hímek vagy F_1 nőstények hím utódai) meiotikus sejtjeiben a diakinézis-I. metafázisban figyelhetők meg. Az XO-nőstények a csontvelői sejtek mitózisa során megfigyelhető, mindössze 39 kromoszóma jelenléte alapján azonosíthatók.

1.5. Minőségi követelmények

Nincsenek.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

Előkészületek

Ahol lehet, a vizsgált anyagokat izotóniás sóoldatban kell feloldani vagy szuszpendálni. A vízben oldhatatlan vegyi anyagokat a megfelelő vivőanyagban lehet feloldani vagy szuszpendálni. A vizsgált vegyi anyag friss készítményeit kell használni. Az alkalmazott vivőanyag nem lehet hatással a vizsgált anyagra, és nem okozhat toxikus hatást.

Az adagolás módja

A vizsgált anyagot orális intubálással vagy intraperitoneális injekcióval kell bejuttatni. Más alkalmazási módok is megfelelőek lehetnek.

A kísérlethez felhasznált állatok

A tenyésztés megkönnyítése és a citológiai megerősítő vizsgálatok miatt e vizsgálatokat egereken végzik. Nincs szükség különleges egértörzsre. Mindazonáltal a törzs átlagos alomszáma nyolcnál nagyobb és viszonylag állandó legyen. Egészséges, ivarérett állatokra van szükség.

Az állatok száma és neme

Az állatok száma a spontán transzlokáció gyakoriságától és a pozitív eredmény eléréséhez szükséges minimális indukciós aránytól függ.

A vizsgálatot rendszerint F_1 hím utódok elemzésével végzik. Dózisonként legalább 500 hím F_1 utódot kell megvizsgálni. Ha F_1 nőstény utódokat is használunk, 300 hímre és 300 nőstényre van szükség.

Negatív és pozitív kontrollok alkalmazása

Egyidejűleg végzett vizsgálatokból és történeti kontrollvizsgálatokból megfelelő kontrolladatoknak kell rendelkezésre állniuk. Ha nemrégen ugyanezen laboratóriumban elvégzett vizsgálatokból elfogadható pozitív kontrolleredmények állnak rendelkezésre, egyidejűleg alkalmazott kontrollok helyett ezek is használhatók.

Adagolási szintek (dózisok)

Egy adagolási szintet vizsgálnak, rendszerint azt a legnagyobb dózist, amely minimális toxikus hatást fejt ki, de még nem befolyásolja a szaporodási viselkedést vagy a túlélést. A dózis-hatás összefüggés megállapításához még legalább két alacsonyabb adaggal kezelt csoportra is szükség van. Nem mérgező anyagoknál a legnagyobb megengedhető adagot használják.

A kísérlet végrehajtása

Kezelés és pároztatás

Kétféle kezelési protokoll áll rendelkezésre. A leggyakrabban alkalmazott a vizsgált anyag egyszeri adagolása. Másik lehetőség a vizsgált anyag adagolása heti hét napon át, 35 napon keresztül. A kezelések utáni pároztatások számát a kezelési protokoll határozza meg, amelynek biztosítania kell, hogy a csírasejtképződés minden kezelt fázisából legyen mintavétel. A párzási időszak végén a nőstényeket egyedileg ketrecbe kell zárni. Elléskor feljegyzik a napot, az alomszámot és az utódok nemét. Valamennyi hím utódot elválasztják, és a nőstény utódokkal nem foglalkoznak, hacsak nem akarják felhasználni azokat is a vizsgálatban.

A transzlokáció-heterozigócia vizsgálata

Az alábbi két módszer egyike használható:

– az F_1 utódok termékenységének vizsgálata és a lehetséges transzlokációk utólagos igazolása citogenetikai elemzéssel,

– valamennyi hím F_1 utód citogenetikai vizsgálata termékenységvizsgálattal végzett előzetes kiválogatás nélkül.

a) Termékenységvizsgálat

Az F_1 utód csökkent termékenységét az alomszám megfigyelésével és/vagy az ezen állattal pároztatott nőstények méhtartalmának vizsgálatával mutathatják ki.

A normális, illetve csökkent termékenység kritériumait a felhasznált egértörzs sajátságainak megfelelően kell meghatározni.

Alomszám-megfigyelések: A vizsgálandó F_1 hímeket ugyanazon vizsgálatból vagy ugyanazon tenyészetből származó nőstényekkel együtt ketrecekbe zárják. A ketreceket a párzás utáni 18. naptól kezdődően naponta megvizsgálják. Az alom létszámát és az F_2 utódok nemét elléskor feljegyzik, az almot ezután eltávolítják. Ha F_1 nőstény utódokat vizsgálnak, a kis almok F_2 utódait további vizsgálatok céljaira megtartják. A nőstény transzlokáció-hordozókat bármely hím utódjuk transzlokációs citogenetikai vizsgálatával azonosíthatják. Az XO-nőstényeket az utódok ivari megoszlásának változásából ismerhetik fel, a hímek és nőstények aránya 1:1-ről 1:2-re változik. A normál F_1 állatokat egy több egymást követő lépésből álló eljárásban kivonják a vizsgálatból, ha az első F_2 alom létszáma eléri vagy meghaladja az előre meghatározott normálértéket, ellenkező esetben viszont a második vagy harmadik F_2 almot is megfigyelik.

Azon F_1 állatokat, amelyeket még a harmadik F_2 alom után sem lehet normálisnak tekinteni, vagy tovább vizsgálják a velük pároztatott nőstények méhtartalmának elemzésével, vagy rögtön citogenetikai vizsgálatnak vetik alá.

A méhtartalom elemzése: A transzlokáció-hordozók alomlétszámának csökkenése az embrionális elhalálozásnak tudható be, ezért nagyszámú elhalt implantátum jelzi a vizsgált állatban kialakult transzlokációt. A vizsgálandó F_1 hímeket két-három nősténnyel pároztatjuk. A fogamzás napját a hüvelyi dugó reggelente történő, napi vizsgálatával állapítják meg. A nőstényeket 14–16 nappal később elpusztítják, és méhükben meghatározzák és feljegyzik az élő, illetve elhalt embriók számát.

b) Citogenetikai elemzés

Levegőn végzett szárítás módszerével here-preparátumokat állítunk elő. A transzlokáció-hordozókat a primer spermatociták I. típusú diakinézis-metafázisban megjelenő polivalens konfigurációi alapján azonosítjuk. Legalább két sejtet kell találni polivalens asszociációval ahhoz, hogy kijelenthessük, a vizsgált állat transzlokáció-hordozó.

Ha nem végeztünk tenyésztési szelekciót, minden F_1 hímet egyenként kell citogenetikailag megvizsgálni. Hímenként legkevesebb 25 I. típusú diakinézis-metafázisban levő sejtet kell mikroszkóposan megvizsgálni. A kis herékkel, illetve a diakinézis előtti meiotikus károsodással rendelkező F_1 hímeknél, valamint azon F_1 nőstényeknél, amelyeknél felmerül az XO-károsodás gyanúja, el kell végezni a spermatogoniumsejtek vagy a csontvelői sejtek mitotikus metafázisainak vizsgálatát is. Egy szokatlanul hosszú és/vagy rövid kromoszóma jelenléte mind a tíz sejtben egy bizonyos, hímsterilitást okozó transzlokációra utal (c-t típus). Egyes X-autoszóma-transzlokációkat, amelyek szintén hímsterilitást okoznak, csak a mitotikus kromoszómák sávos elemzésével lehet kimutatni. Ha mind a 10 mitózisban 39 kromoszómát találunk, az a nőstény XO-kromoszóma eltérését bizonyítja.

2. ADATOK

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni.

Minden párzási időszakra megadják a szülői párosításból származó átlagos alomszámot és a nemek arányát születéskor és a szoptatástól való elválasztáskor.

Az F_1 állatok termékenységvizsgálatát, a normálpárok átlagos alomszámát és az F_1 transzlokáció-hordozók egyedenkénti alomszámát is bemutatják. A méhtartalom-elemzésnél a normálpárok élő és elhalt implantátumainak átlagos számát viszonyítják az F_1 transzlokáció-hordozók párosításából származó élő és elhalt implantátumok egyedenkénti számához.

Az I. típusú diakinézis-metafázis citogenetikai elemezésekor a különféle típusú polivalens konfigurációk számát és a teljes sejtszámot sorolják fel minden transzlokáció-hordozó esetében.

A steril F_1 egyedeknél a teljes párzási számot és a párosodási időszak hosszát jegyzik fel. Megadják a herék súlyának és a citogenetikai elemzés eredményének adatait.

Az XO-nőstények esetében az átlagos alomszámot, az F_2 nemzedék ivararányát és a citogenetikai elemzés eredményeit kell megadni.

Ha az F_1 transzlokáció-hordozókat termékenységvizsgálattal előszelektáljuk; ilyenkor a táblázatoknak azt is be kell mutatniuk, hogy ezek közül hány állat bizonyult heterozigótának a transzlokáció szempontjából.

A negatív és a pozitív kontrollvizsgálatok adatait egyaránt jegyzőkönyvezni kell.

3. ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– az egértörzs neve, az állatok kora, a kezelt állatok testsúlya,

– a szülő állatok száma nemenként a vizsgálati és a kontrollcsoportokban,

– a vizsgálati feltételek, a kezelés részletes leírása, dózisok, oldószerek, a párzási ütemterv,

– az utódok száma és neme nőstényenként, a transzlokáció-elemzésre szánt utódok száma és neme,

– a transzlokáció-elemzés időpontja és kritériumai,

– a transzlokáció-hordozók száma és részletes ismertetése, beleértve a tenyésztési adatokat és a méhtartalom adatait is, ha alkalmazhatók,

– a citogenetikai eljárások és a mikroszkópos elemzés részletei, lehetőség szerint képekkel,

– az eredmények statisztikai feldolgozása,

– az eredmények megvitatása,

– az eredmények értelmezése.

3.2. Értékelés és értelmezés

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

4. HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM

Lásd az Általános bevezetés B. részét.

C. RÉSZ: AZ ÖKOTOXICITÁS MEGHATÁROZÁSÁNAK MÓDSZEREI

ÁLTALÁNOS BEVEZETÉS: C. RÉSZ

Az alábbiakban részletezett vizsgálati módszerek a 79/831/EGK irányelv VIII. mellékletében felsorolt, egyes környezeti (öko-) toxikológiai tulajdonságok meghatározását szolgálják. Nem szabad megfeledkezni arról, hogy a VIII. melléklet 1. szintjén jellemzett tulajdonságok közül a szöveg az alábbiakra nem tartalmaz meghatározási módszereket:

– hosszú távú toxicitásvizsgálat *Daphnia magnával,*

– vizsgálat magasabb rendű növényekkel,

– hosszú távú toxicitásvizsgálat halakon,

– fajakkumulációs vizsgálat.

Amennyiben a fenti tulajdonságok meghatározására szolgáló vizsgálati módszerek véglegesítése megtörténik, azok a későbbiekben a műszaki fejlődéshez történő hozzáigazítás formájában kerülnek közzétételre. Mindaddig a szöveg alkalmazóinak alkalmas, nemzetközileg elfogadott módszereket kell használniuk, és azokról az illetékes hatóságokat értesíteniük kell.

NÖVEKEDÉSGÁTLÁSI VIZSGÁLAT ALGÁKON

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

A vizsgálat célja, hogy valamely anyagnak az egysejtű zöldalgafajok növekedésére gyakorolt hatását meghatározzák. Viszonylag rövid idejű vizsgálatokkal is több nemzedéken keresztül figyelhetők meg a hatások. A módszer több egysejtű algafajjal való használatra is adaptálható, ám ez esetben az alkalmazott módszer leírását is mellékelni kell a vizsgálati jelentéshez.

A jelen módszer legkönnyebben vízben jól oldódó vizsgálati anyagokra alkalmazható, amelyek a vizsgálati körülmények között nagy valószínűséggel vízben oldott állapotban maradnak.

A vizsgálati tápfolyadékban korlátozottan oldódó anyagok esetében az EC_{50} meghatározása nehézségekbe ütközhet (lásd alább a fogalommeghatározásoknál).

A jelen módszer csak olyan anyagokra alkalmazható, amelyek nem befolyásolják közvetlenül az algák növekedését.

A vizsgálat elvégzésekor az alábbi információk lehetnek hasznosak:

– vízoldékonyság,

– páranyomás,

– szerkezeti képlet,

– az anyag tisztasági foka,

– kémiai stabilitás vízben és fénynek kitéve,

– az anyag vízben oldott mennyiségének meghatározására alkalmas elemzési módszerek,

– pK_a-érték,

– n-oktanol-víz megoszlási együttható,

– egy kész lebomlási vizsgálat eredménye.

1.2. Fogalommeghatározások és egységek

Sejtkoncentráció: a sejtek száma egy milliliterenként.

Növekedés: a sejtkoncentráció növekedése a vizsgálati időszak alatt.

Növekedési sebesség: a sejtkoncentráció növekedése egységnyi idő alatt.

EC_{50}: a jelen módszer szerint a vizsgált anyagnak az a koncentrációja, amely vagy a növekedés, vagy a növekedési sebesség kontrollhoz viszonyított mértékének 50 %-os csökkenését idézi elő.

NOEC (nem észlelhető hatás koncentrációja): a jelen módszer szerint az a legnagyobb vizsgált koncentráció, amely mellett a mért paraméter(ek) nem mutat(nak) észlelhető növekedésgátló hatást a kontrollértékekhez képest.

1.3. Referenciaanyagok

A referenciaanyag arra használható, hogy a nem kielégítő vizsgálati körülményeket kimutassuk. Referenciaanyag használata esetén az azzal kapott eredményeket fel kell tüntetni a vizsgálati jelentésben. Referenciaanyagként kálium-dikromátot használhatunk.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A kiválasztott zöldalgafaj exponenciálisan növekvő sejtkultúráit több nemzedéken keresztül meghatározott körülmények között kezeljük a vizsgált anyag különféle koncentrációival. Meghatározzuk, hogy az algasejtek növekedésének gátlása milyen mértékű volt egy adott időszak alatt a kontrollkultúrákhoz képest.

1.5. **Minőségi követelmények**

1.5.1. *A vizsgálat érvényességének feltételei*

A kontrollkultúrákban a sejtek koncentrációjának három nap alatt legalább 16-szorosára kell növekednie.

A vizsgált anyagnak a vízből való eltűnése és megjelenése a biomasszában nem feltétlenül érvényteleníti a vizsgálati eredményeket.

1.6. **A vizsgálati eljárás leírása**

1.6.1. *Előkészületek*

1.6.1.1. Berendezések és anyagok

– szokásos laboratóriumi felszerelés,

– megfelelő méretű vizsgálati lombikok (pl. 250 ml-es Erlenmeyer-lombik alkalmas a célra, ha a vizsgált oldat térfogata 100 ml),

– sejttenyésztésre alkalmas berendezések: olyan szekrény vagy kamra, ahol a hőmérséklet 21 és 25 ± 2 °C közötti tartományban tartható, illetve folyamatos, egyenletes megvilágítás 400 és 700 nm közötti hullámhosszon. (Ajánlott kvantumfluxus 0,72 x 10^{-20} foton/m^2s ± 20 % eltéréssel. A sugárzási kvantumnak ez az árama 120 μE/m^2s-nak felel meg, és ez univerzális fehér fényű fluoreszcens lámpával érhető el [a fény hőmérséklete megközelítőleg 4 200 K], amely gömbkollektoros mérésben megközelítőleg 8 000 luxot eredményez.),

– a sejtkoncentráció meghatározására alkalmas készülék, pl. elektronikus részecskeszámláló, sejtszámláló kamrával ellátott mikroszkóp, fluoriméter, spektrofotométer, koloriméter (*megjegyzés:* ha a spektrofotométerrel alacsony sejtszámoknál is használható mérési eredményeket akarunk kapni, legalább 4 cm-es fényúttal rendelkező küvették használata lehet szükséges).

1.6.1.2. Algatáptalaj

A következő összetételű táptalaj ajánlott:

NH_4Cl:	15	mg/l,
$MgC1_2.6H_2O$:	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/1,
$MnCl_2.4H_2O$:	0,415	mg/l,
$ZnCl_2$:	3×10^{-3}	mg/l,
$CoCl_2.6H_2O$:	$1,5 \times 10^{-3}$	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.

Levegővel történt kiegyenlítést követően a táptalaj pH-ja megközelítőleg 8.

Más táptalaj alkalmazását a fenti ajánlás nem zárja ki akkor, ha a lényeges összetevők tekintetében a következő határértékeket nem lépi túl:

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

A fentebb ajánlott táptalaj és az (1) hivatkozásban említett tápfolyadék megfelel e követelménynek.

1.6.1.3. Vizsgált organizmusok

A fajok kiválasztása

Ajánlatos gyorsan növekvő zöldalgafajt választani, amely könnyen tenyészthető, és kényelmesen vizsgálható. Az alábbi fajokat tekinthetjük alkalmasnak:

– *Selenastrum capricornutum* ATCC 22662,

– *Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG,

– *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11 b.

Ha ettől eltérő fajt használunk, a törzset is fel kell tüntetni.

1.6.1.4. Vizsgálati körülmények

Kiindulási sejtkoncentráció

A sejtkultúrában a kiindulási sejtkoncentráció ajánlott értéke megközelítőleg 10^4 sejt/ml *Selenastrum capricornutum* és *Scenedesmus subspicatus* esetében. Ha ettől eltérő fajokat használunk, a biomassza ezzel összehasonlítható mennyiségű legyen.

A vizsgált anyag koncentrációi

Azt a koncentrációtartományt, amelyen belül toxikus hatások várhatóak, előzetes, dózisbehatároló vizsgálatokkal határozzuk meg. Ehhez legalább öt koncentrációból álló mértani sort kell kiválasztani. A legkisebb koncentráció nem gyakorolhat észlelhető hatást az algasejtek növekedésére. A legmagasabb vizsgált koncentrációnak a kontrollhoz képest legalább 50 %-os csökkenést kell eredményeznie, és kedvező esetben a növekedést teljesen le is állítja.

Ismétlések és kontrollok

A vizsgálat kedvező esetben három ismétlést tartalmaz minden koncentrációra, és kétszer annyi kontrollt. Indokolt esetben a vizsgálat menete úgy is módosítható, hogy növelik a koncentrációk számát, és csökkentik egy-egy koncentrációnál az ismétlések számát.

Ha vivőanyagot használnak a vizsgált anyag feloldására, további kontrollokat kell használni a vizsgálat során, amelyek a vivőanyagot a vizsgált kultúrákban alkalmazott legnagyobb koncentrációban tartalmazzák.

1.6.2. *A kísérlet végrehajtása*

E szakasz iránymutatást tartalmaz a jól oldódó, a rosszul oldódó, valamint az illékony anyagok vizsgálatára vonatkozóan.

1.6.2.1. Vízben könnyen oldódó anyagok vizsgálata

A vizsgált anyag kívánt koncentrációját és az alga kívánt kiindulási mennyiségét tartalmazó sejtkultúrát úgy készítik el, hogy a vizsgált anyag, illetve az algaszuszpenzió törzsoldatainak előre szétosztott kisebb mennyiségeit szűrtalga-tápoldattal hígítják.

A tenyésztőlombikokat felrázzák, és a sejttenyésztő berendezésbe helyezik. A vizsgálat során fontos, hogy az algasejtek szuszpendálva maradjanak, és megfelelően érje a sejteket a CO_2. Ezért a lombikot rázatni, kevertetni, illetve levegőztetni kell. A kultúrák hőmérsékletének a 21 és 25 °C közötti tartományban kell maradnia, ± 2 °C eltéréssel.

A sejtek koncentrációját a vizsgálat megkezdését követően minden lombikban legalább a 24., a 48. és a 72. órában meg kell határozni. Szűrtalga-tápoldatot használunk részecskeszámláló esetén a háttér meghatározására, spektrofotométernél pedig vakpróbaként.

A pH-t a vizsgálat elején és 72 óra elteltével mérjük.

Az oldatok pH-változása szokásos esetben nem haladhatja meg az egy egységet a vizsgálat ideje alatt.

1.6.2.2. Vízben nehezen oldódó anyagok vizsgálata

Ha a vizsgált anyag oldhatósága a vizsgálat során alkalmazott legnagyobb koncentráció nagyságrendjében van, akkor a fent ismertetett eljárástól csak csekély mértékben kell eltérni a vizsgált oldatok készítésekor. A vizsgált anyag telített oldata használható törzsoldatként. Egy másik megközelítés, hogy a vizsgált anyagot az algasejtek szuszpenziójának hozzáadását megelőzően oldják fel kívánt koncentrációban az alga tápoldatában.

A vízben rosszul oldódó anyagok törzsoldatainak készítésekor mechanikus diszpergálást vagy az algákra nem mérgező vivőanyagot használhatnak, például szerves oldószereket, emulgeálószereket vagy diszpergálószereket. Ha vivőanyagot használnak, annak koncentrációja nem haladhatja meg a 100 mg/litert, valamint további kiegészítő kontrollokat kell beállítani a vizsgálat megtervezésekor, amelyekben a vivőanyag a vizsgálati oldatban található legnagyobb koncentrációban szerepel.

1.6.2.3. Illékony anyagok vizsgálata

Az illékony anyagok vizsgálatának jelenleg nincs általánosan elfogadott módszere. Ha egy anyagról tudjuk, hogy könnyen párolog, zárt vizsgálati lombikokat lehet használni, amelyekben megnöveljük a tápoldat feletti levegő mennyiségét. E módszernek több különböző változatát kidolgozták már (lásd az (1) hivatkozást).

Meg kell kísérelni az oldatban maradt anyag mennyiségének meghatározását, és különleges óvatosságot ajánlunk olyan vizsgálati eredmények értelmezésekor, amelyeket illékony vegyi anyagok zárt rendszerekben történt vizsgálatakor nyertünk.

2. ADATOK ÉS ÉRTÉKELÉS

A vizsgálati sejttenyészetekben és a kontrollokban mért sejtkoncentráció-értékeket táblázatba foglaljuk a vizsgált anyag koncentrációival és a mérési időkkel együtt. A növekedési görbék elkészítése során az idő függvényében ábrázoljuk a kontrollok és a vizsgált anyag különböző koncentrációinak átlagértékeit.

A koncentráció-hatás összefüggés meghatározásához az alábbi két megközelítés alkalmazható.

2.1. **A növekedési görbék alatti terület összehasonlítása**

A növekedési görbe alatti területet az alábbi képlettel lehet kiszámítani:

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

ahol:

A = terület,

N_0 = a sejtek névleges száma milliliterenként a t_0 időpontban,

N_1 = a sejtek mért száma milliliterenként a t_1 időpontban,

N_n = a sejtek mért száma milliliterenként a t_n időpontban,

t_1 = a vizsgálat megkezdése utáni első mérés időpontja,

t_n = a vizsgálat megkezdése utáni n-edik mérés időpontja.

Az egyes vizsgáltanyag-koncentrációkra eső sejtnövekedés-gátlás százalékos értékét (I_a) a kontrollgörbe alatti terület (A_c), valamint az egyes vizsgáltanyag-koncentrációk esetén kialakuló növekedési görbék alatti terület (A_t) közötti különbségből számítjuk ki:

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

Az I_A-értékeket fél-logaritmikus papíron vagy fél-logaritmikus probit papíron a megfelelő koncentrációk függvényében ábrázoljuk. Ha probit papíron dolgozunk, a pontokat szemmértékkel igazítjuk egy egyenes vonalhoz, míg ha az értékekről normál logaritmusos megoszlás feltételezhető, akkor számított regressziós vonalat lehet húzni.

Az EC_{50}-értéket a (regressziós) vonal és az I_A = 50 %-nál a vízszintes tengelyt metsző párhuzamos vonal metszéspontja adja. Ahhoz, hogy e számítási módszerben egyértelművé tegyük ezen érték megadását, célszerű az E_bC_{50} elnevezés alkalmazása. E módszerrel kapcsolatban az egyes időpontokban (24, 48 és 72 óránál) végzett méréseknél az elnevezés E_bC_{50} (0–72 h)-ra változik.

Más EC-értékek – például az E_bC_{10} – szintén számíthatók az I_A *versus* logaritmusos koncentráció görbéből.

2.2. **A növekedési sebességek összehasonlítása**

Az átlagos specifikus növekedési sebesség (μ) az exponenciálisan növekvő kultúrákban az alábbi egyenlet szerint számítható ki:

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

Másik lehetőségként az átlagos specifikus növekedési sebesség származtatható az ln N *versus* idő függvény regressziós vonalának meredekségéből is.

Az átlagos specifikus növekedési sebesség százalékos csökkenése a vizsgált anyagok egyes koncentrációinál egybevethető a kontrollértékkel, és a koncentráció logaritmusa függvényében ábrázolható. A koncentrációkhoz tartozó EC_{50}-értékek leolvashatók az eredményül kapott grafikonról. Ahhoz, hogy a szóban forgó számítási módszerben kapott EC_{50}-értéket egyértelművé tegyük, célszerű az E_rC_{50} elnevezés alkalmazása. A mérések időpontját is jelezni kell, például ha az érték a 24 órás és a 48 órás mérésre vonatkozik, az elnevezés E_rC_{50} (24–48 h)-ra változik.

Megjegyzés: a specifikus növekedési sebesség egy logaritmikus paraméter, és ezért a sebességben bekövetkező kis változások is jelentős változásokat eredményezhetnek a biomasszában. Ezért az E_bC- és az E_rC-értékek numerikusan nem hasonlíthatók össze.

3. **ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS**

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– vizsgált anyag: kémiai azonosító adatok,

– vizsgált organizmusok: eredet, laboratóriumi tenyészet, törzs száma, tenyésztés módja,

– vizsgálati körülmények:

  – a vizsgálat kezdetének és végének időpontja, illetve a vizsgálat időtartama,

  – hőmérséklet,

  – a tápfolyadék összetétele,

– tenyésztőkészülék,
– az oldatok pH-ja a vizsgálat kezdetén és végén (ha a pH-ban egy egységnél nagyobb eltérés figyelhető meg, magyarázattal kell szolgálni),
– a vizsgált anyag oldhatóvá tételére alkalmazott módszer és vivőanyag, valamint a vivőanyag koncentrációja a vizsgált oldatokban,
– a fény intenzitása és minősége,
– vizsgált koncentrációk (mért vagy névleges).

– eredmények:
– az egyes lombikok sejtkoncentrációja az egyes mérési pontoknál és a sejtkoncentráció mérésének módszere,
– a sejtkoncentrációk átlagértékei,
– növekedési görbék,
– a koncentráció-hatás összefüggés grafikus ábrázolása,
– EC-értékek és kiszámításuk módja,
– NOEC,
– egyéb megfigyelt hatások.

4. HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM

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.

Függelék

PÉLDA AZ ALGATENYÉSZTÉSI ELJÁRÁSRA

Általános megfigyelések

Az alábbiakban ismertetett eljárások alapján végzett tenyésztés célja a toxicitásvizsgálatokhoz használható algatenyészetek létrehozása.

Olyan alkalmas módszereket kell használni, amelyekkel megelőzhető az algatenyészet baktériumos fertőződése (ISO 4833). Idegen szervezetektől mentes (axenikus) kultúrák kívánatosak lehetnek, az azonban mindenképpen létfontosságú, hogy csak egyféle algasejt legyen jelen.

Minden műveletet steril körülmények között kell végezni az egyéb algasejtekkel vagy baktériumokkal való szennyeződés elkerülése érdekében.

Berendezések és anyagok

Lásd az 1.6.1. pontban: Előkészületek és vizsgált organizmusok.

Az algakultúrák kialakításának eljárásai

Tápoldatok (médiumok) elkészítésének módja

A tápoldat összes tápsóját koncentrált törzsoldat formájában készítik el, és sötét, hűvös helyen tárolják. Az oldatokat szűréssel vagy autoklávozással sterilizálják.

A tápoldatot a törzsoldatok megfelelő mennyiségeinek steril desztillált vízhez adásával készítik el, ügyelve arra, hogy ne fertőződjön be. Szilárd táptalaj készítésekor 0,8 % agar-agart is kell adni a fenti oldathoz.

Törzstenyészet

A törzstenyészetek olyan, kicsiny algasejtkultúrák, amelyeket rendszeresen friss médiumba tesznek át, hogy azokat kiindulási anyagként lehessen felhasználni a vizsgálatkor. Ha a tenyészeteket nem használják rendszeresen, ferde agart tartalmazó kémcsövekben szélesztik azokat. Ezeket legalább kéthavonta át kell oltani friss táptalajra.

A törzstenyészeteket a hozzávaló tápoldatot tartalmazó Erlenmeyer-lombikban tenyésztik (ennek térfogata körülbelül 100 ml). Ha az algákat folyamatos megvilágítás mellett 20 °C-on inkubáljuk, az átoltást hetente kell elvégezni.

Az átoltás során a „régi" kultúrából bizonyos mennyiséget steril pipettával egy lombiknyi új tápoldatba viszünk át úgy, hogy a gyorsan növekvő fajok esetén a kiindulási sejtkoncentráció körülbelül századrésze legyen a régi kultúráénak.

Valamely faj növekedési ütemét a növekedési görbéről olvashatjuk le. Ha ez ismert, meg lehet becsülni azt a sűrűséget, amelynél a kultúrát át kell oltani az új táptalajra. Ezt még az előtt el kell végezni, hogy a kultúra elérné a pusztulási fázist.

Előtenyészet

Az előtenyészet célja a vizsgált kultúra elindításához szükséges mennyiségű alga előállítása. Az előtenyészetet a vizsgálattal megegyező körülmények között inkubálják, és akkor használják fel, amikor az algasejtek szaporodása még az exponenciális fázisban van, vagyis szokásos esetben egy körülbelül háromnapos inkubációs időszakot követően. Ha az algakultúrák deformált vagy rendellenes sejteket tartalmaznak, a tenyészetet ki kell dobni.

TOXICITÁS FÖLDIGILISZTÁKRA

MESTERSÉGES TALAJBAN VÉGZETT VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

A szóban forgó laboratóriumi vizsgálatban a vizsgált anyagot olyan mesterséges talajhoz adják hozzá, amelyben 14 napra földigilisztákat helyeznek el. Ezt az időszakot követően (másik lehetőségként hét nap elteltével) megvizsgálják az anyagnak a földigilisztákra gyakorolt letális hatását. A módszer a vegyi anyagnak a földigilisztákra a bőrükön keresztül, illetve a tápcsatornából történő felszívódás következtében gyakorolt hatásának viszonylag gyors kiszűrését teszi lehetővé.

1.2. Fogalommeghatározás és mértékegység

LC_{50}: Az anyagnak az a koncentrációja, amely a vizsgálati időszak alatt a kísérleti állatok 50 %-át pusztítja el.

1.3. Referenciaanyagok

Rendszeres időközönként referenciaanyagot kell használni annak igazolására, hogy a vizsgálati rendszer érzékenysége nem változott-e jelentős mértékben.

Referenciaanyagként analitikai tisztaságú klóracetamidot ajánlunk.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A talaj változó közeg, ezért a vizsgálathoz gondosan összeállított, mesterséges vályogtalajt kell használni. A vizsgált anyag különféle koncentrációival kezelt mesterséges talajban az *Eisenia foetida* (lásd a Függelék megjegyzését) fajhoz tartozó felnőtt példányokat tartanak. A tárolóedények tartalmát a vizsgálat megkezdése után 14 nappal (és választhatóan hét nap elteltével) szétterítik egy tálcán, majd megszámolják az egyes koncentrációk mellett életben maradt földigilisztákat.

1.5. Minőségi követelmények

A vizsgálatot úgy kell megtervezni, hogy az a vizsgált talaj és szervezet tekintetében minél jobban ismételhető legyen. A kontrollcsoportban az elhullási arány nem haladhatja meg a 10 %-ot, különben a vizsgálat nem értékelhető.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

1.6.1. *Anyagok*

1.6.1.1. Vizsgált talaj

Meghatározott összetételű mesterséges talajt kell használni.

a) Alapszubsztrátum (a száraz tömeg százalékában)

- 10 % tőzegmohatőzeg (*Sphagnum*) (a pH 5,5 és 6,0 közötti értékhez a lehető legközelebb, úgy, hogy ne maradjon benne látható növénymaradvány, finomra őrölve),
- 20 % kaolinitagyag, lehetőleg 50 %-nál több kaolinittel,
- körülbelül 69 % ipari kvarchomok (domináns mennyiségű finom homok, több mint 50 %-ban 0,05 és 0,2 mm közötti szemcsenagysággal). Ha az anyag vízben nem oszlatható el eléggé, edényenként 10 g homokot tartalékban kell tartani, hogy később hozzáadhassák a vizsgált szubsztrátumhoz,
- mintegy 1 % vegytiszta, porított kalcium-karbonát ($CaCO_3$) hozzáadásával a pH-t 6,0 ± 0,5-re állítják be.

b) Vizsgált szubsztrátum

A vizsgált szubsztrátum az alapszubsztrátumot, a vizsgált anyagot és az ionmentesített vizet tartalmazza.

Víztartalmának az alapszubsztrátum száraz tömegének 25 és 42 %-a közé kell esnie. A szubsztrátum víztartalmának meghatározásához a mintát 105 °C-on állandó tömegig kell szárítani. A legfontosabb feltétel az, hogy a mesterséges talajt át kell nedvesíteni, de nem szabad azon víznek állni. Ügyelnünk kell rá, hogy a vizsgált anyagot és a vizsgált szubsztrátumot egyenletesen keverjük el egymással. A vizsgálati jelentésben fel kell jegyezni, hogyan vittük bele a vizsgált anyagot a szubsztrátumba.

c) Kontrollszubsztrátum

A kontrollszubsztrátum az alapszubsztrátumból és vízből áll. Ha bármely más adalékanyagot alkalmazunk, kiegészítő kontrollt is kell használni, amelyben az adott adalékanyagból ugyanannyi található.

1.6.1.2. Vizsgálati edények

Körülbelül egy liter űrtartalmú (szellőzőlyukakkal ellátott, műanyag fedővel, kupakkal vagy műanyag fóliával lefedett) üvegedények a szubsztrátum 500 g szárazanyag-tartalmának megfelelő mennyiségben a nedves vizsgált talajjal, illetve a kontrolltalajjal feltöltve.

1.6.2. *Vizsgálati körülmények*

Az edényeket 20 ± 2 °C hőmérsékletű klímakamrában kell tartani folyamatos megvilágítás mellett. A fény intenzitásának 400 és 800 lux között kell lennie.

A vizsgálat időtartama 14 nap, de a mortalitást meg lehet vizsgálni a vizsgálat megkezdését követő hetedik napon is.

1.6.3. *A kísérlet végrehajtása*

Vizsgált koncentrációk

A vizsgált anyag koncentrációit az alapszubsztrátum száraz tömegéhez viszonyított tömegként adják meg (mg/kg).

Dózisbehatároló vizsgálat

Azon koncentrációtartományok, amelyek 0 és 100 % közötti mortalitást váltanak ki, előzetes vizsgálattal azonosíthatók azzal a céllal, hogy tájékozódjanak a részletes meghatározó vizsgálatban alkalmazható koncentrációtartományokról.

Az anyagot a következő koncentrációkban lehet vizsgálni: 1 000; 100; 10; 1; 0,1 mg anyag/kilogramm vizsgált talaj (száraz tömeg).

Ha teljes körű meghatározó vizsgálatot akarunk végezni, az előzetes, dózisbehatároló vizsgálatban minden koncentrációra és a kezeletlen kontrollra elegendő egy-egy, 10 gilisztát tartalmazó vizsgálati csoport.

Meghatározó vizsgálat

Az előzetes, dózisbehatároló vizsgálat eredményeit arra használják fel, hogy a 0 és 100 % közötti mortalitási tartományban egy legalább öt koncentrációból álló mértani sort jelöljenek ki, amelyben az állandó szorzótényező legfeljebb 1,8.

Ezen vizsgálati sorral végzett vizsgálatok lehetővé teszik az LC_{50}-érték, illetve a konfidenciaszint lehető legpontosabb meghatározását.

A meghatározó vizsgálat során koncentrációnként legalább négy kísérleti csoportot és négy kezeletlen kontrollt kell használni, amelyek mindegyike 10-10 gilisztát tartalmaz. Ezen ismétlések eredményei adják az átlagértékeket és a normál szórást.

Ha két egymást követő és egymástól az 1,8-as faktort meghaladó mértékben nem különböző koncentráció csak 0 %-os és 100 %-os mortalitást ad, ezen értékek már elegendőek annak jelzésére, hogy az LC_{50} melyik tartományba esik.

Az alapszubsztrátum és a vizsgált talaj keveréke

A vizsgált talajt lehetőleg minden más szer hozzáadása nélkül, csak vízzel kell összeállítani. Közvetlenül a vizsgálat megkezdése előtt a vizsgált anyag ionmentesített vízben vagy egyéb oldószerben elkészített diszperzióját, illetve emulzióját elkeverik az alapszubsztrátummal, illetve finom kromatográfiás vagy ehhez hasonló szórókészülékkel egyenletesen eloszlatják az alapszubsztrátum felületén.

Ha a vizsgált anyag nem oldódik vízben, a lehető legkisebb mennyiségű megfelelő szerves oldószerben is feloldható (például hexánban, acetonban vagy kloroformban).

A vizsgált anyag oldatba vitelére, diszpergálására vagy emulgeálására csak könnyen illó oldószer használható. A vizsgált talajt a felhasználás előtt át kell szellőztetni. Az elpárolgott vízmennyiséget pótolni kell. A kontrollhoz bármely adalékanyagból azonos mennyiséget kell adni.

Ha a vizsgált anyag szerves oldószerekben egyáltalán nem oldódik, nem diszpergálható, és nem emulgeálható, finomra őrölt kvarchomok és a vizsgált anyag 500 g száraz tömegű mesterséges talaj kezelésére elegendő mennyiségének keverékéből 10 g-ot kell elkeverni 490 g száraz tömegű vizsgált talajjal.

Minden kísérleti csoportban 500 g száraz tömegnek megfelelő mennyiségű nedves vizsgált talajt helyeznek el, üvegedényenként 10 db gilisztával, amelyeket előzőleg hasonló nedves környezetben szoktattak 24 órán keresztül, majd gyorsan megmosták azokat, a felesleges vizet szűrőpapírral felszívatták, és a gilisztákat a szubsztrátum felületére helyezték.

A tárolóedényeket perforált műanyag fedővel, kupakkal vagy fóliával zárják le, hogy a talajt megóvják a kiszáradástól, majd 14 napon keresztül tartják a vizsgálati körülmények között.

Az értékelést a vizsgálat megkezdését követő 14. napon (és esetleg a 7. napon) lehet elvégezni. A talajt üveg- vagy rozsdamentes acéllemezen terítik szét. A gilisztákat megvizsgálják, és megállapítják a vizsgálatot túlélők számát. Az a giliszta tekinthető élettelennek, amely az elülső végét érő enyhe mechanikai ingerre nem reagál.

Ha a hetedik napon végeznek vizsgálatot, a tartályba visszatöltik a talajt, és a túlélő gilisztákat ugyanarra a vizsgálati talajfelületre helyezik vissza.

1.6.4. *Vizsgált organizmusok*

Vizsgált organizmusok: felnőtt *Eisenia foetida*-példányok (lásd a Függelék megjegyzését) (legalább két hónaposak, amelyeknél a clitellum [nyereg] már kialakult), 300 és 600 mg közötti nedves súllyal. (A tenyésztési módszereket lásd a Függelékben.)

2. ADATOK

2.1. Az eredmények értékelése és értelmezése

A vizsgált anyag koncentrációit rögzítik, mellettük megadva az egyes koncentrációkhoz tartozó elhullott giliszták számát százalékban.

Ha elegendő adat áll rendelkezésre, a szabványmódszerrel meg kell határozni az LC_{50}-értéket és a konfidencia-határértékeket (p = 0,05) (ezzel egyenértékű módszer Litchfield és Wilcoxon, 1949). A vizsgált anyag LC_{50}-értékét milligrammban kell megadni a vizsgált talaj kilogrammjára (száraz tömeg) vonatkoztatva.

Azon esetekben, amikor a koncentrációs görbe túlságosan meredek az LC_{50} kiszámításához, ezen érték grafikus becslése is elegendő.

Ha két egymást követő és egymástól az 1,8-as szorzótényezőnél nagyobb mértékben nem különböző koncentráció csak 0 %-os és 100 %-os elhullást ad, ezen értékek már elegendőek annak jelzésére, hogy az LC_{50} melyik tartományba esik.

3. ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– nyilatkozat arról, hogy a vizsgálatot a fent említett minőségi követelményeknek megfelelően végezték,

– az elvégzett vizsgálatok (előzetes, dózisbehatároló vizsgálat és/vagy meghatározó vizsgálat),

– a vizsgálati körülmények pontos leírása, illetve nyilatkozat arról, hogy a vizsgálatot a módszernek megfelelően végezték-e el; minden eltérést jelezni kell,

– annak pontos leírása, hogy a vizsgált anyagot hogyan keverték bele a vizsgált talajba,

– a felhasznált vizsgált organizmusokkal kapcsolatos információk (faj, kor, súly-szélsőértékek és -átlag, tartási és tenyésztési körülmények, származás),

– az LC_{50} meghatározásához használt módszer,

– az összes felhasznált adatot tartalmazó vizsgálati eredmények,

– a vizsgált organizmusok viselkedésében megfigyelt tünetek vagy változások leírása,

– a kontrollok mortalitása,

– az LC_{50}, illetve a legmagasabb vizsgált koncentráció, amely a vizsgálat beindítását követő 14 nappal (és esetleg hét nappal) már elhullást nem eredményezett, és a legkisebb vizsgált koncentráció, amely ugyanezen időpontban már 100 %-os elhullást eredményezett,

– a koncentráció-hatás görbe felvétele,

– a referenciaanyaggal kapott eredmények, akár a mostani vizsgálatokkal kapcsolatosan, akár korábbi minőség-ellenőrzési próbán nyerték azokat.

4. HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM

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

2. Edwards, C. A. and Lofty, J. R., 1977, *Biology of Earthsworms,* 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- and Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag 'Toxisitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden', in: Rudolph/Boje, *Ökotoxikologie,* ecomed, Landsberg, 1986.

Függelék

A giliszták tenyésztése és tartása a vizsgálat előtt

Az állatok tenyésztéséhez 30–50 darab felnőtt gilisztára van szükség, amelyeket friss szubsztrátummal ellátott tenyésztőládába helyeznek, majd 14 nap múlva eltávolítják azokat. Ezen állatokat használhatják fel a további tenyészetekhez. A gubóból kikelt giliszta felnőtt (ivarérett) korában használható fel a vizsgálatokhoz (a leírt feltételek mellett ez két-három hónap után következik be).

Tenyésztési és tartási körülmények

Klímakamra:	20 ± 2 °C hőmérséklet, lehetőleg folyamatos megvilágítással (400 és 800 lux közötti fényintenzitással).
Tenyésztő ládák:	10–20 liter űrtartalmú, megfelelően lapos edények.
Szubsztrátum:	Az *Eisenia foetida* többféle állati ürüléken is tenyészthető. Tenyésztő közegként 50 térfogat-százalékos tőzeg és 50 térfogat-százalékos tehén- vagy lótrágya keveréke ajánlott. A közeg pH-értéke körülbelül 6 és 7 között legyen (ezt kalcium-karbonáttal lehet szabályozni), és alacsony ionos vezetőképességgel kell rendelkeznie (6 mmhos-nál vagy 0,5 % sókoncentrációnál kevesebb).
	A szubsztrátum legyen nedves, de ne legyen túl vizes.
	A fent említett módszeren kívül még más sikeres módszer is alkalmazható.

Megjegyzés: Az *Eisenia foetida* két fajban létezik, amelyeket egyes taxonómusok külön alfajként írtak le (Bouche, 1972). Ezek morfológiailag nem különböznek, de egyikük, az *Eisenia foetida foetida* gyűrűin jellegzetes keresztirányú csíkozást vagy szalagokat találhatunk, amelyek a másikon, az *Eisenia foetida andrei* fajon nem jelennek meg, ellenben ennek vörösesebb színe van. Ha lehet, az *Eisenia foetida andrei* használatát javasoljuk. Más faj is használható, ha a hozzá szükséges módszertan rendelkezésre áll.

BIOLÓGIAI LEBOMLÁS

ZAHN–WELLENS VIZSGÁLAT

1. **MÓDSZER**

1.1. **Bevezetés**

E módszernek az a célja, hogy felmérje a vízoldékony, nem illékony szerves anyagok végső biológiai lebontásának lehetőségeit akkor, ha statikus vizsgálati körülmények között viszonylag nagy töménységű mikroorganizmusnak vannak kitéve.

A szuszpendált szilárd részecskéken fizikokémiai adszorpció is létrejöhet, és ezt az eredmények értékelésekor figyelembe kell venni (lásd a 3.2. pontot).

A használni kívánt anyagokat 50 és 400 mg/liter közötti DOC-értékeknek, valamint 100 és 1 000 mg/liter közötti COD-értékeknek megfelelő koncentrációban vizsgáljuk (DOC = oldott szerves szén; COD = kémiai oxigénigény). E viszonylag magas koncentrációknak az az előnye, hogy analitikailag megbízhatóak. Mérgező tulajdonságú vegyületek késleltethetik vagy gátolhatják a lebomlás folyamatát.

E módszerben az oldott szerves szén vagy a kémiai oxigénigény mérését a vizsgált anyag végső biológiai lebonthatóságának felmérésére használjuk.

Az ezzel párhuzamosan alkalmazott analitikai módszer segíthet az anyag primer lebomlásának meghatározásában (a kiindulási molekulaszerkezet eltűnése).

A módszer csak olyan vizsgált szerves anyagra megfelelő, amely a vizsgálatban használt koncentrációban:

– a vizsgálati körülmények között vízben oldódik,

– páranyomása a vizsgálati körülmények között elhanyagolható,

– a baktériumokat nem gátolja,

– a vizsgálati rendszerben csak korlátozott mértékben szívódik fel,

– habképződés útján nem vész el a vizsgált oldatból.

A vizsgált anyag főbb összetevőinek egymáshoz viszonyított részarányának ismerete hasznos lehet a kapott eredmények értékeléséhez, különösen azon esetekben, amikor az eredmények (lebomlási értékek) alacsonyak vagy marginálisak.

Az anyag mikroorganizmusokra gyakorolt mérgező hatásának ismerete kívánatos az alacsony lebomlási értékek értékelésénél és a megfelelő vizsgált koncentrációk kiválasztásánál.

1.2. **Fogalommeghatározások és mértékegységek**

A vizsgálat végén nyert lebomlási mértéket mint a „Zahn–Wellens vizsgálatban kapott biológiai lebonthatóságot" kell értékelni:

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

ahol:

D_T = biológiai lebomlás (%) T idő alatt,

C_A = DOC- (vagy COD-) értékek a vizsgált keverékben a vizsgálat megkezdését követő három óra múlva (mg/l) (DOC = oldott szerves szén, COD = kémiai oxigénigény)

C_T = DOC- (vagy COD-) értékek a vizsgált keverékben mintavételkor (mg/l),

C_B = DOC- (vagy COD-) értékek a vakpróbában mintavételkor (mg/l),

C_{BA} = DOC- (vagy COD-) értékek a vakpróbában a vizsgálat megkezdését követő három óra múlva (mg/l).

A lebomlás mértékét a legközelebbi teljes százalékértékre kell kerekíteni.

A százalékos lebomlást a vizsgált anyag DOC- (vagy COD-) százalékának csökkenésével kell megadni.

A mért vagy számított kiindulási érték és a három óra elteltével mért érték közötti különbség hasznos információkkal szolgálhat az anyag megsemmisítésével kapcsolatban (lásd a 3.2. pontot, Az eredmények értelmezése).

1.3. **Referenciaanyagok**

Egyes esetekben, ha új anyagokat vizsgálunk, hasznos lehet a referenciaanyagok alkalmazása; konkrét referenciaanyagok ajánlása azonban egyelőre nem lehetséges.

1.4. **A vizsgálati módszer elve**

Keverőszerkezettel és levegőztetőberendezéssel ellátott, négyliteres üvegedénybe élesztett iszapot, ásványi tápanyagokat és egyedüli szénforrásként a vizsgált anyagot helyeznek el a vizes oldatban. A keveréket kevertetik, levegőztetik, és 20 és 25 °C hőmérséklet között, diffúz megvilágításban vagy sötétkamrában tartják 28 napon keresztül. A lebomlási folyamatot a szűrt oldat DOC-, illetve COD-értékeinek naponkénti vagy egyéb megfelelő időközönként végzett meghatározása útján követik nyomon. Az indulást követő három óra elteltével mért érték és az egyes időközökben eltűnt DOC (vagy COD) mért értékeinek egymáshoz viszonyított arányát százalékos biológiai bomlás formájában fejezik ki, és ez szolgál a lebomlás adott időre számított mértékéül. Az eredményt az idő függvényében ábrázolva kapják meg a biológiai bomlás görbéjét.

Ha specifikus analitikai módszert használnak, mérhető a kiindulási molekula koncentrációjának a biológiai bomlás következtében előállott változása is (elsődleges biológiai bonthatóság).

1.5. **Minőségi követelmények**

A vizsgálat kielégítő mértékű ismételhetőségét körvizsgálat bizonyította.

A módszer érzékenységét nagymértékben a vakpróba változékonysága és kisebb mértékben az oldott szerves szén, illetve a vizsgált vegyület folyadékkoncentrációjának kimutatási pontossága határozza meg.

1.6. **A kísérlet végrehajtása**

1.6.1. *Előkészületek*

1.6.1.1. Reagensek

A vizsgálathoz használt víz: kevesebb mint 5 mg/liter szerves szenet tartalmazó ivóvíz. A kalcium- és magnéziumionok együttes koncentrációja nem haladhatja meg a 2,7 mmol/litert; ellenkező esetben ionmentesített vagy desztillált vízzel való hígításra van szükség.

Kénsav, analitikai reagens (A.R.):	50 g/l
Nátrium-hidroxid-oldat A.R.:	40 g/l
Ásványitápanyag-oldat: oldjunk fel egy liter ionmentesített vízben:	
ammónium-kloridot, NH_4Cl, A.R.:	38,5 g,
nátrium-dihidrogén-foszfátot, $NaH_2PO_4.2H_2O$, A.R.:	33,4 g,
kálium-dihidrogén-foszfátot, KH_2PO_4, A.R.:	8,5 g,
dikálium-monohidrogén-foszfátot, K_2HPO_4, A.R.:	21,75 g.

A keverék tápoldatként és pufferként egyaránt szolgál.

1.6.1.2. Készülékek

Egy és négy liter közötti űrtartalmú üvegedények (pl. üveghengerek).

Üveg- vagy fémlapáttal ellátott és megfelelő tengelyre szerelt keverőkészülék (a lapátnak az edény fenekétől 5–10 cm távolságra kell forognia). Helyette 7 és 10 cm közötti hosszúságú, rúddal felszerelt mágneses keverő is használható.

2 és 4 mm közti belső átmérőjű üvegcső a levegőztetésre. A cső nyílása az edény fenekétől kb. 1 cm-re legyen.

Centrifuga (kb. 3 550 g).

PH-mérő.

Oldottoxigénkoncentráció-mérő készülék.

Szűrőpapírok.

Membránszűrő készülék.

Membránszűrők 0,45 μm-es pórusokkal. A membránszűrők akkor felelnek meg a célnak, ha meggyőződtek róla, hogy sem szenet nem bocsátanak ki, sem pedig a vizsgált anyagot nem abszorbeálják a szűrés során.

A szervesszén-tartalom, illetve a kémiai oxigénigény meghatározására alkalmas analitikai berendezés.

1.6.1.3. Az inokulum előkészítése

A biológiai szennyvíztisztítóból származó aktivált szennyvíziszapot (ismételten) kimossák és centrifugálják, vagy azt a vizsgálathoz használt vízzel ülepítik (lásd fent).

Az aktivált iszapnak megfelelő állapotban kell lennie. Az ilyen iszap valamely megfelelően működő szennyvíztisztítóból könnyen beszerezhető. Annak érdekében, hogy a lehető legtöbb baktériumfajt, illetve baktériumtörzset szerezzék be, érdemes különböző forrásból származó inokulumokat összekeverni (pl. több szennyvíztisztítóból, különböző talajkivonatokat, folyókból származó vizet stb.). A keveréket a fentieknek megfelelően kell kezelni.

Az aktivált iszap aktivitásának ellenőrzését lásd az alábbiakban, a „Funkcionális ellenőrzés" című szakaszban.

1.6.1.4. A vizsgált oldat előkészítése

A vizsgálathoz használt edénybe 500 ml vizet, 2,5 ml/liter ásványitápanyag-oldatot és 0,2–1,0 g szárazanyag/liter végkoncentrációjú aktivált iszapot kell önteni. Hozzá kell adni megfelelő mennyiségű törzsoldatot a vizsgált anyagból úgy, hogy a végső keverékben a DOC-koncentráció 50 és 400 mg/liter között legyen. Az ennek megfelelő COD-értékek 100 és 1 000 mg/liter között változnak. A vizsgálathoz használt vízzel ki kell egészíteni összesen egy-négy literre. A mennyiség megválasztása a DOC- és COD-meghatározásokhoz veendő minták számától és az analízishez szükséges térfogattól függ.

Általában két liter elegendő. Legalább egy kontrolledényt (vakot) kell beállítani minden vizsgálati sorhoz; ebben csak aktivált iszap és ásványi tápoldat van, amelyet a vizsgálati edényekben lévő térfogattal megegyező térfogatra kell kiegészíteni.

1.6.2. *A kísérlet végrehajtása*

A vizsgálati edényeket mágneses vagy csavaros keverővel diffúz megvilágításban vagy egy sötét szobában 20 és 25 °C közötti hőmérsékleten kell kikeverni. A levegőztetést tisztítás céljából vattaszűrőn és szükség esetén mosópalackon keresztül fúvatott sűrített levegővel érik el. Biztosítani kell, hogy az iszap ne ülepedjen le, és az oxigénkoncentráció ne essen 2 mg/liter alá.

A pH-értéket rendszeres időközönként (pl. naponta) ellenőrizni kell, és szükség esetén be kell állítani 7 és 8 közé.

A párolgási veszteséget közvetlenül a mintavétel előtt ionmentesített vagy desztillált vízzel a megfelelő mennyiségben pótolni kell. Jó módszer, ha a folyadék szintjét a vizsgálatok megkezdése előtt jelöljük az edény falán. Minden mintavétel után új jelet tesznek (levegőztetés és keverés nélkül). Az első mintákat mindig a vizsgálat megkezdését követő három óra múlva veszik, hogy kiderítsék, felszívódott-e a vizsgált anyag az aktivált iszapba.

A vizsgált anyag eltűnését követően naponta vagy más rendszeres időközben végeznek DOC- vagy COD-meghatározást. A vizsgálati edényből és a vakpróbából származó mintákat gondosan átmosott szűrőpapíron átszűrik. Az oldat szűrletének első 5 ml-ét eldobják. A nehezen szűrhető iszapot előzetesen tízperces centrifugálással távolítják el. A DOC- és COD-meghatározásokat legalább két párhuzamos mintán el kell végezni. A vizsgálatot 28 napon át folytatják.

Megjegyzés: A továbbra is zavaros mintákat membránszűrőn szűrik át. A membránszűrő nem bocsáthat ki, és nem vehet fel szerves anyagokat.

Az aktivált iszap funkcionális ellenőrzése

Valamely ismert anyagot tartalmazó edényt is be kell állítani a vizsgálati sorba, hogy ellenőrizzék az aktivált iszap működőképességét. E célra a dietilén-glikol megfelelő.

Adaptáció

Ha az elemzéseket viszonylag rövid időközönként végzik (például naponta), az adaptáció a bomlási görbéből világosan felismerhető (lásd a 2. ábrát). Ezért nem célszerű a vizsgálatot közvetlenül a hétvége előtt megkezdeni.

Ha az adaptáció a vizsgálati időszak vége felé jelenik meg, a vizsgálatot meg lehet hosszabbítani, amíg a lebomlás be nem fejeződött.

Megjegyzés: Ha szükség van bővebb ismeretekre az adaptálódott iszap viselkedésével kapcsolatosan, ugyanazt az aktivált iszapot kell még egyszer ugyanazon vizsgált anyaggal kezelni, az alábbi eljárás szerint:

Kikapcsolják a keverőgépet és a szellőztetőberendezést, majd hagyják, hogy az aktivált iszap leülepedjen. Leszívják a felülúszó folyadékot, vízzel feltöltik két literre, 15 percig keverik, majd hagyják, hogy ismét leülepedjen. Miután a felülúszót ismét leszívták, a visszamaradt iszapot arra használják, hogy a vizsgálatot ugyanazon anyaggal a fenti 1.6.1.4. és 1.6.2. pontnak megfelelően megismételjék. Az aktivált iszap ülepítés helyett centrifugálással is elkülöníthető.

Az adaptált iszapot friss iszappal is elkeverhetik literenként 0,2–1 g közötti száraz tömeg/liter koncentrációig.

Analitikai eszközök

A mintákat szokásos esetben gondosan átmosott szűrőpapíron szűrik meg (a mosáshoz ionmentesített vizet kell használni).

A továbbra is zavaros mintákat membránszűrőn is át kell szűrni (0,45 μm).

A DOC-koncentrációt a TOC-műszer segítségével két párhuzamos mintán határozzák meg a minták szűrleteiből (az első 5 ml-t kiöntik). Ha a szűrletet nem tudják ugyanazon a napon elemezni, azokat másnapig hűtőszekrényben kell tárolni. Ennél hosszabb tárolás nem ajánlott.

A COD-koncentráció meghatározását a minta szűrletéből a hivatkozott szakirodalomban másodikként feltüntetett dokumentumban ismertetett eljárás szerint végzik el.

2. ADATOK ÉS ÉRTÉKELÉS

A DOC- és/vagy COD-koncentrációkat legalább két párhuzamos mintán kell meghatározni a fentebb említett 1.6.2. pont szerint. A T időben fennálló bomlás mértékét a fentebb az 1.2. pontban ismertetett képlet alapján számolják ki.

A bomlás mértékét a legközelebbi egész százalékra kerekítik. A vizsgálat végén kapott bomlási értéket a jegyzőkönyvben „Biológiai lebonthatóság a Zahn–Wellens vizsgálat szerint" címen rögzítik.

Megjegyzés: Ha teljes bomlást észlelünk a vizsgálati idő lejárta előtt, és az eredményt a következő napon megismételt elemzés is megerősíti, a vizsgálatot le lehet zárni.

3. ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– az anyag kiindulási koncentrációja,

– minden egyéb információ és a vizsgált anyagra, a referenciaanyagra – ha volt –, valamint a vakpróbára vonatkozó vizsgálati eredmények,

– koncentráció három óra elteltével,

– biológiai bomlási görbe, leírással,

– dátum és helyszín, ahonnan a vizsgálati organizmusok mintáját vettük, adaptációs állapotuk, a felhasznált koncentráció stb.,

– a vizsgálati eljárásban történt bármely változtatás tudományos okai.

3.2. Az eredmények értelmezése

A DOC (COD) eltűnése, amely fokozatosan, napok vagy hetek alatt játszódik le, azt jelzi, hogy a vizsgált anyag biológiai úton bomlik le.

Bizonyos esetekben azonban a fizikokémiai felszívódás is szerepet játszhat, amit az jelez, ha rögtön az első három órán belül teljesen vagy részben eltűnik az anyag, és a kontroll-, valamint a vizsgálati edényben mért felülúszó folyadék mennyisége közötti különbség jóval a várt szint alatt marad.

További vizsgálatokra van szükség, ha az adszorpciót és a tényleges (vagy részleges) biológiai bomlást szándékoznak elkülöníteni.

Számos lehetőség kínálkozik, de ezek közül a legmeggyőzőbb az, ha a felülúszót vagy az iszapot használják fel kiindulási törzsként (inokulum) egy alapvizsgálathoz (lehetőleg egy respirometriás vizsgálathoz).

Azon vizsgált anyagok, amelyek DOC- (COD-) értékei a szóban forgó vizsgálat során gyorsan és nem felszívódás útján csökkennek, biológiailag lebonthatónak tekinthetők. A részleges és nem felszívódás útján történő kiürülés azt jelzi, hogy a vegyület legalább részben bomlik biológiailag. Ha a DOC- (COD-) érték nem vagy csak alig csökken, annak oka lehet az is, hogy a vizsgált anyag gátolja a mikroorganizmusokat, amit az is jelezhet, hogy az iszap szétesik és elvész, zavaros felülúszót eredményezve. Ilyenkor a vizsgálatot a vizsgált anyag alacsonyabb koncentrációjával kell megismételni.

Vegyületspecifikus analitikai módszerek vagy a ^{14}C izotóppal jelölt vizsgált anyag használata nagyobb érzékenységet tesz lehetővé. Ha ^{14}C izotóppal jelölt vegyületet alkalmaznak, a biológiai bomlás tényét a $^{14}CO_2$ kinyerési aránya fogja megerősíteni.

Ha az eredményeket elsődleges biológiai bomlás formájában adják meg, lehetőség szerint magyarázatot kell adni a kémiai szerkezet olyan jellegű változását illetően, amely a kiindulási vegyület ismételt fellelésének hiányát okozza.

A vak vizsgálati közeg válaszreakciója mellett az analitikai módszer hitelesítését is meg kell adni.

4. HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM

1. OECD, 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.

Függelék

ÉRTÉKELÉSI PÉLDA

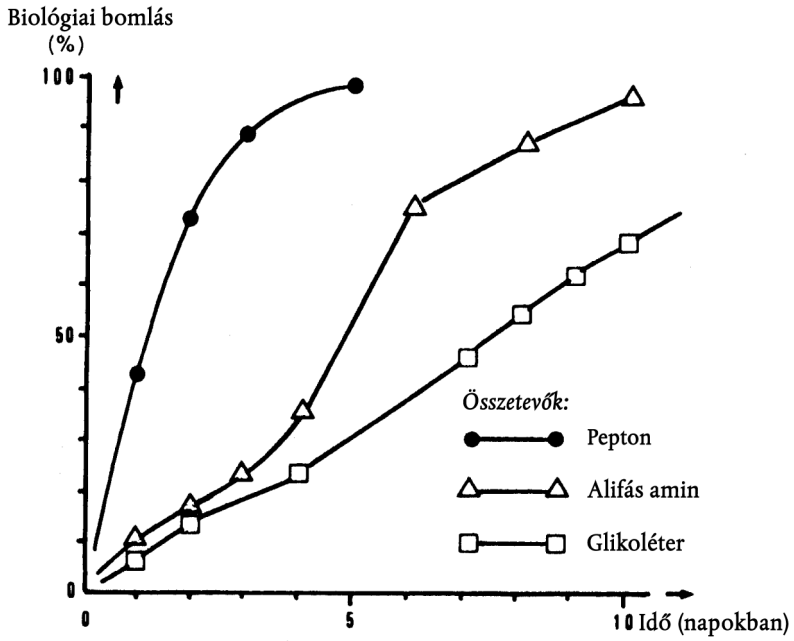
Szerves vegyület:	4-etoxi-benzoesav
Elméleti vizsgálati koncentráció:	600 mg/l
Elméleti DOC-tartalom:	390 mg/l
Oltóanyag (inokulum)	szennyvíztisztító telep
Koncentráció:	1 gramm szárazanyag-tartalom/liter
Adaptációs állapot:	nincs adaptálva
Elemzés:	DOC-meghatározás
A minta mennyisége:	3 ml
Kontrollvegyület:	dietilén-glikol
A vegyület toxicitása:	1 000 mg/l alatt nincs toxikus hatás Használt vizsgálat: fermentációs kémcsőpróba

Vizsgálati idő	Kontrollanyag				Vizsgált anyag		
	Vak DOC (1) mg/l	DOC (1) mg/l	Nettó DOC mg/l	Bomlás %	DOC (1) mg/l	Nettó DOC mg/l	Bomlás %
0	–	–	300,0	–	–	390,0	–
3 óra	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 nap	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 nap	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 nap	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 nap	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 nap	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 nap	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 nap	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 nap	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

(1) Három párhuzamos meghatározás átlagértéke.

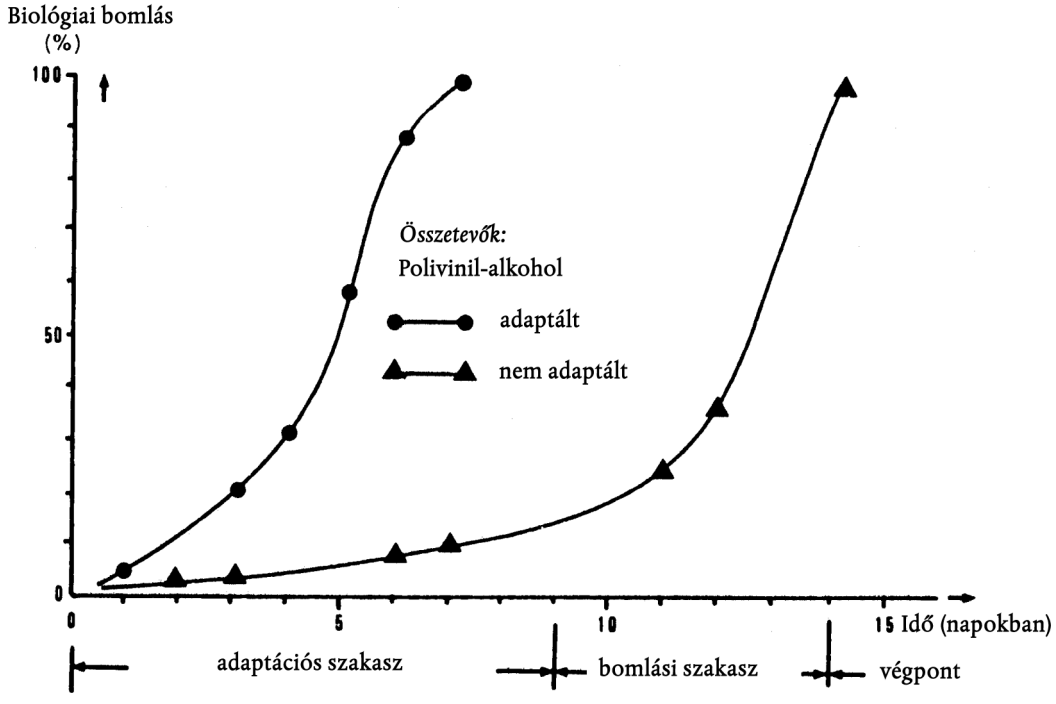
1. ábra

Biológiai bomlás görbéje (példa)



2. ábra

A szennyviziszap adaptálása (példa)



BIOLÓGIAI LEBOMLÁS

ELEVENISZAP-SZIMULÁCIÓS VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

1.1.1. *Általános megjegyzések*

A módszer csak olyan szerves vizsgált anyagokra alkalmas, amelyek a kísérletben használt koncentrációban:

– a vizsgált oldat előállításához szükséges mértékben vízben oldódnak,

– páranyomása a vizsgálati körülmények között elhanyagolható,

– a baktériumokat nem gátolják.

- A vizsgált anyag főbb összetevői egymáshoz viszonyított részarányának ismerete hasznos lehet a kapott eredmények értékelése során, különösen azon esetekben, amikor az eredmények alacsony számértékűek vagy marginálisak.

Az anyag mikroorganizmusokra gyakorolt toxikus hatásának ismerete kívánatos az alacsony számértékű eredmények értékelésénél és a megfelelő vizsgált koncentrációk kiválasztásánál.

1.1.2. *A végső biológiai lebonthatóság meghatározása (DOC-/COD-elemzés)*

A módszer célja, hogy a vizsgált anyag egy 12 mg DOC/liter (vagy megközelítőleg 40 mg COD/liter) értéket meghaladó koncentrációjú, megfelelő aktiváltszennyvíziszap-modellben történő kivonásának mérése útján meghatározza az anyag végső biológiai lebonthatóságát; a legkedvezőbbnek a 20 mg DOC/liter érték tűnik. (DOC = oldott szerves szén; COD = kémiai oxigénigény).

A vizsgált anyag szervesszén-mennyiségét (vagy kémiai oxigénigényét) kell meghatározni.

1.1.3. *Az elsődleges biológiai lebonthatóság meghatározása (specifikus analízis)*

A módszer célja, hogy specifikus elemző eljárás segítségével körülbelül 20 mg/literes koncentrációnál meghatározzuk valamely anyag elsődleges biológiai lebonthatóságát az aktiváltszennyvíziszap-modellben (ennél nagyobb és kisebb koncentrációk is alkalmazhatók, ha az analitikai módszer és a toxicitási megfontolások lehetővé teszik). Ezzel lehetővé válik az anyag primer lebomlásának meghatározása (a kiindulási kémiai szerkezet eltűnése).

A módszernek *nem* célja a vizsgált anyag mineralizációjának meghatározása.

A vizsgált anyag meghatározásához megfelelő elemzési módszernek kell rendelkezésre állnia.

1.2. Fogalommeghatározások és mértékegységek

1.2.1. *DOC/COD-elemzés*

Az anyag eltávolításának mértékét a következő képlet adja meg:

$$DR = \frac{T - (E - E_o)}{T} \times 100\,\% \qquad [1(a)]$$

ahol:

DR = a DOC (vagy COD) értékének százalékos csökkenése a vizsgált anyagra vonatkozó átlagos visszatartási időn belül,

T = a vizsgált anyag koncentrációja a beömlő anyagban mg DOC/literben (vagy mg COD/literben),

E = DOC- (vagy COD-) koncentrációs érték a vizsgálati egység kifolyásánál mg DOC/liter (vagy mg COD/liter),

Eo = DOC- (vagy COD-) koncentrációs érték a vakpróba kifolyásánál mg DOC/liter (vagy mg COD/liter).

A lebomlást a vizsgált anyagra vonatkozó átlagos visszatartási időn belül a DOC-(vagy COD-) érték százalékos csökkenésével adjuk meg.

1.2.2. *Specifikus analízis*

A vizsgált anyagnak az R_W vizes fázisból az adott átlagos visszatartási időn belül történő eltűnését százalékos értékben a következő képlet mutatja:

$$R_W = \frac{C_I - C_O}{C_I} \times 100\ \% \qquad [1(b)]$$

ahol:

C_1 = az anyag koncentrációja a vizsgálati egység beömlésénél (mg anyag/liter, a specifikus analízis eredménye alapján),

C_o = az anyag koncentrációja a vizsgálati egység kifolyásánál (mg anyag/liter, a specifikus analízis eredménye alapján).

1.3. **Referenciaanyagok**

Egyes esetekben, ha új anyagokat vizsgálunk, hasznos lehet a referenciaanyagok alkalmazása; konkrét referenciaanyagok ajánlása azonban egyelőre nem lehetséges.

1.4. **A vizsgálati módszerek alapelve**

A végső biológiai lebonthatóság meghatározásához két aktiváltszennyvíziszap-vizsgálati egységet (OECD-megerősítő vizsgálatot vagy lyukacsos edényt) működtetnek párhuzamosan. A vizsgált anyagot a beömlő szennyvízhez adagolják (mesterséges vagy kommunális szennyvíz) az egyik egységnél, míg a másik csak a szennyvizet kapja. Az elsődleges biológiai lebonthatóságnak a beömlésnél, illetve a kifolyásnál specifikus analitikai módszerekkel történő meghatározásához csak az egyik egységet használják.

A DOC- és COD-koncentrációkat a kifolyásnál mérik, vagy specifikus elemzéssel meghatározzák az anyagok koncentrációit.

A vizsgált anyaghoz tartozó DOC-értéket nem mérik, csak megállapítják.

Ha DOC- (vagy COD-) méréseket hajtanak végre, a vizsgálati és a kontroll kifolyási értékek közötti különbséget a le nem bomlott vizsgált anyagnak tulajdonítják.

Ha specifikus elemzéseket végeznek, a kiindulási molekula koncentrációjának változását lehet mérni (elsődleges biológiai lebonthatóság).

Az egységeket egy átoltási eljárás révén „kapcsolt egység üzemmódban” is lehet üzemeltetni.

1.5. **Minőségi követelmények**

Az anyag kiindulási koncentrációja az elvégzett elemzés típusán és korlátain múlik.

1.6. **A vizsgálati módszer leírása**

1.6.1 *Előkészületek*

1.6.1.1. Készülékek

Ugyanolyan típusú egységből kell két darab, kivéve, amikor specifikus elemzéseket végzünk.

Kétféle berendezés áll rendelkezésünkre:

OECD-megerősítő vizsgálat

A készülék (1. függelék) szintetikus szennyvíz tárolására alkalmas tartályból (A), adagolószivattyúból (B), levegőztetőedényből (C), szeparátorból (D), az aktivált iszapot visszaforgató légszivattyúból (E), valamint a kezelt kifolyó anyag összegyűjtésére szolgáló edényből (F) áll.

Az (A) és (F) edénynek üvegből vagy megfelelő műanyagból kell készülnie, és legalább 24 liter űrtartalmúnak kell lennie. A (B) szivattyú folyamatos áramlási sebességen szállítja a szintetikus szennyvizet a levegőztetőedényhez; ehhez bármilyen alkalmas rendszer megfelel, feltéve, hogy biztosítani tudja a befolyás mértékét és koncentrációját. A szokásos működés során a szeparátor (D) magasságát úgy kell rögzíteni, hogy a levegőztetőedényben található kevert folyadék térfogata három liter legyen. A (C) edényben a kúp hegyénél szinterelt levegőztetőkockát (G) függesztünk fel. A levegőztetőn keresztül áramló levegő mennyiségét áramlásmérővel szabályozhatjuk.

A légszivattyút (E) úgy állítják be, hogy a szeparátorról kikerülő aktivált iszap folyamatosan és rendszeresen visszavezethető legyen a levegőztetőedénybe.

„Lyukacsos edény"

A lyukacsos edény 2 mm vastag és 95 mikrométer legnagyobb pórusátmérőjű, porózus polietilén lapokból áll, amelyeket 14 cm átmérőjű, 45°-ban kúposan végződő hengerekbe hajtanak be (lásd a 2. függelék 1. és 2. ábráját). A lyukacsos edény egy másik, megfelelő műanyagból készült, nem áteresztő, 15 cm átmérőjű edényben van, amelynek kivezetése a hengeres részen 17,2 cm magasan található, ami az edény térfogatát is meghatározza (3 liter). A belső edény felső végét megfelelő műanyagból készült, merev támasztógyűrű tartja, ami által a belső és külső edény között egy 0,5 cm széles kifolyási tér keletkezik.

A lyukacsos edények termosztáttal ellátott vízfürdő fenekére szerelhetők. A belső edény aljához levegőellátást kell csatolni, amelyen megfelelő diffúzorok találhatók.

Az (A) és (E) edénynek üvegből vagy megfelelő műanyagból kell készülnie, és legalább 24 liter űrtartalmúnak kell lennie. A (B) szivattyú folyamatos áramlási sebességen szállítja a szintetikus szennyvizet a levegőztetőedényhez; ehhez bármilyen alkalmas rendszer megfelel, feltéve, hogy biztosítani tudja a befolyás mértékét és koncentrációját.

Tartalék lyukacsos edényeket kell készenlétben tartani a használat közben eltömődöttek felváltására; az eltömődött edényeket előbb 24 órára hipokloritoldatba merítjük, majd csapvízzel alaposan elmossuk.

1.6.1.2. Szűrés

Membránszűrő berendezés és membránszűrők 0,45 μm-es pórusokkal. A membránszűrők akkor felelnek meg a célnak, ha meggyőződtünk róla, hogy sem szenet nem bocsátanak ki, sem pedig a vizsgált anyagot nem szívják magukba a szűrés során.

1.6.1.3. Szennyvíz

Megfelelő szintetikus tápoldat vagy kommunális szennyvíz használható.

A szintetikus szennyvíz összetétele (példa):

Egy liter csapvízben a következő anyagokat oldják fel:

Pepton:	160 mg,
Húskivonat:	110 mg,
Karbamid:	30 mg,
NaCl:	7 mg,
$CaCl_2.2H_2O$:	4 mg,
$MgSO_4.7H_2O$:	2 mg,
K_2HPO_4:	28 mg.

Kommunális szennyvíz

Ezt naponta frissen kell begyűjteni egy főként kommunális szennyvizet fogadó szennyvízkezelő telep első ülepítőtartályának túlfolyójából.

1.6.1.4. A vizsgált anyag törzsoldata

A vizsgált anyag törzsoldata, pl. 1 %-os, elkészítésére van szükség, amelyet a vizsgálati egységhez adunk hozzá. Az anyag koncentrációját meg kell határozni, hogy tudjuk, mekkora kellő mennyiséget kell a szennyvízbe vagy egy második pumpa segítségével közvetlenül a vizsgálati egységbe adagolni a kívánt vizsgált koncentráció eléréséhez.

1.6.1.5. Inokulum

Megjegyzés: Ha kommunális szennyvizet használunk, nincs értelme kevés baktériumot tartalmazó inokulumot használni, ehelyett aktivált szennyvíziszapot használhatunk.

Számosfajta inokulum használható.

Példának három, megfelelő eredményt adó inokulum kerül ismertetésre:

a) Másodlagos kifolyásnál gyűjtött inokulum

Az inokulumot jó minőségű másodfokú kifolyásból is lehet nyerni, ha azt főként kommunális szennyvíz tisztításával foglalkozó telepről gyűjtik. A szennyvizet a mintavétel és a felhasználás közötti időszakban aerob körülmények között kell tartani. Az inokulum előkészítéséhez a mintát szűrik át egy durva szűrőn, és az első 200 ml szűrletet öntik ki. A szűrletet is aerob körülmények között szükséges tartani felhasználásig. Az inokulumot az elkészítés napján fel kell használni. A beoltáshoz legalább 3 ml szűrletet kell felhasználni.

b) Összetett inokulum

Másodlagos kifolyásnál gyűjtött inokulum:

Leírását lásd fent.

Talajból gyűjtött inokulum:

100 g (termékeny és nem meddő) kerti talajt szuszpendálnak 1 000 ml klórmentes ivóvízben. (A rendkívül nagy agyag-, homok- vagy humusztartalmú talajok nem alkalmasak a célra.) Elkeverés után a szuszpenziót 30 percig ülepedni hagyják. A felülúszót durva szűrőpapíron átszűrik, az első 200 ml-t kiöntik. A szűrletet azonnal levegőztetni kell, és aerob körülmények között kell tartani felhasználásig. Az inokulumot az elkészítés napján fel kell használni.

Felszíni vízből gyűjtött inokulum:

Az inokulum további alkotórészét közepesen szennyezett felszíni vízből nyerik. A mintát egy durva szűrőn átszűrik, és az első 200 ml-t kiöntik. A szűrletet aerob körülmények között kell tartani felhasználásig. Az inokulumot az elkészítés napján fel kell használni.

A háromféle oltóminta azonos térfogatát összeöntik, jól elkeverik, és a végleges inokulumot ebből a keverékből veszik ki. A beoltáshoz legalább 3 ml szűrletet kell használni.

c) Aktivált szennyvíziszapból származó inokulum

Valamely elsődlegesen kommunális szennyvizet tisztító szennyvízkezelő telep levegőztetőtartályából vett (3 liternél nem nagyobb térfogatú) aktivált szennyvíziszap használható fel inokulumnak (a szuszpendáltszilárdüledék-tartalom legfeljebb 2,5 g/liter).

1.6.2. *A kísérlet végrehajtása*

A vizsgálatot szobahőmérsékleten végzik, 18 és 25 °C között.

Adott esetben a vizsgálatot elvégezhetjük ennél alacsonyabb hőmérsékleti viszonyok mellett is (egészen 10 °C-ig); ha az anyag lebomlott, akkor további vizsgálatokra rendszerint nincs szükség. Ha azonban nem bomlott le, a vizsgálatot állandó, 18 és 25 °C közötti szobahőmérsékleten kell megismételni.

1.6.2.1. Felfuttatási szakasz: iszapképződés/az egységek stabilizálása

Az iszap növekedési/stabilizációs ideje az az időszak, amelynek során az aktivált szennyvíziszapban szuszpendált szilárd üledék koncentrációja és az egységek teljesítménye állandó állapotot ér el az adott üzemeltetési körülmények között.

A felfuttatási időszak a vizsgált anyag első alkalommal való hozzáadásától addig tart, amíg eltávolítása egy platót (viszonylag állandó értéket) ér el. Ez az időszak nem lehet hosszabb hat hétnél.

Az értékelési időszak egy háromhetes időszak, amelyet attól az időponttól kell számítani, amikor a vizsgált anyag eltávolítása elért egy aránylag állandó és rendszerint magas értéket. Azon anyagok esetében, amelyek nem vagy csak kis mértékben mutatnak biológiai lebonthatóságot az első hat hét során, az értékelési időszaknak az ezt követő három hetet kell tekinteni.

Először meg kell tölteni a vizsgálathoz szükséges egységet (egységeket) az inokulummal kevert szennyvízzel.

Ezt követően működésbe kell hozni a levegőztetőt (és az OECD-megerősítésivizsgálat-egységeknél az (E) légszivattyút), valamint az adagolóeszközt (B).

A vizsgált anyagot nem tartalmazó szennyvíznek először a levegőztetőedényen kell keresztülhaladnia (C), óránként egyliteres vagy óránként félliteres sebességgel; ezáltal az átlagos visszatartási idő három, illetve hat óra lesz.

A levegőztetés mértékét úgy kell szabályozni, hogy a (C) edény tartalma folyamatosan szuszpendált állapotban maradjon, és közben az oldottoxigén-tartalom legalább 2 mg/liter legyen.

A habképződést megfelelő eszközökkel meg kell akadályozni. Nem használható azonban az aktivált iszapokban zajló folyamatot akadályozó habzásgátló anyag.

A (C) levegőztetőedény tetején (az OECD-megerősítési vizsgálat egységekben pedig a (D) ülepítőedény alján, valamint a cirkulációs egységben) összegyűlt iszapot naponta legalább egyszer kefével vagy egyéb alkalmas eszközzel vissza kell terelni a folyadékkeverékbe.

Ha az iszap nem ülepszik le, sűrűségét 2 ml 5 %-os vas-klorid adagjainak – szükség esetén ismételt – hozzáadásával lehet növelni.

A kifolyó szennyvizet 20–24 órán keresztül az (E vagy F) edényben gyűjtik, és az alapos összekeverését követően mintát vesznek belőle. Az edényt (E vagy F) gondosan kitisztítják.

A folyamat hatékonyságának ellenőrzésére és nyomon követésére az összegyűlt kifolyó szennyvíz szűrletéből, valamint a megszűrt befolyó szennyvízből hetente legalább két alkalommal meghatározzák a kémiai oxigénigényt (COD), illetve az oldott szervesszén-tartalmat (DOC) (0,45 μm pórusátmérőjű membránnal és a szűrlet első, megközelítőleg 20 ml-es mennyiségét kiöntve).

Ha nagyjából szabályos napi lebomlási érték állt be, a DOC- és COD-értékek csökkenése is megállapodik.

Az aktivált iszap szárazanyag-tartalmát a levegőztetőtartályban hetente kétszer kell meghatározni (g/liter mértékegységben). Az egységeket kétféle módon üzemeltethetik: vagy az aktivált iszap szárazanyag-tartalmát határozzák meg hetente kétszer, és ha az meghaladja a 2,5 g/liter értéket, a felesleget kiveszik, vagy pedig minden edényből naponta 500 ml kevert folyadékot vesznek úgy ki, hogy az átlagos iszap-visszatartási idő hat nap maradjon.

Ha a mért és a becsült paraméterek (a folyamat DOC- és COD-csökkenés révén becsült hatékonysága, az iszap töménysége, üledékképző hajlandósága, a kifolyó szennyvíz zavarossága stb.) a két egységben már kellőképpen állandó értékre álltak be, az egyik egység befolyó szennyvizéhez az 1.6.2.2. pontban leírt módon hozzáadhatják a vizsgált anyagot.

A vizsgált anyagot választhatóan az iszap növekedési időszakának az elején is bekeverhetik (1.6.2.1.), különösen, ha inokulum formájában adják hozzá.

1.6.2.2. A kísérlet végrehajtása

A felfuttatási időszak üzemeltetési feltételeit itt is megtartják, és a vizsgált anyag törzsoldatának kellő mennyiségét (megközelítőleg 1 %) adják hozzá a szennyvízhez a vizsgálati egység beömlésénél, hogy a szennyvízben kialakuljon a vizsgált anyag kívánt koncentrációja (megközelítőleg 10–20 mg DOC/liter vagy 40 mg COD/liter között). Ez úgy érhető el, ha a vizsgált anyag törzsoldatát egy külön szivattyúrendszerrel naponta bekeverik a szennyvízbe. A koncentrációt fokozatosan lehet elérni. Ha a vizsgált anyagnak semmilyen toxikus hatása nincs az aktivált iszapra, magasabb koncentrációkat is lehet vizsgálni.

A kontrollegységet csak a szennyvízzel járatják, a vizsgált anyag hozzáadása nélkül. A kifolyó szennyvízből megfelelő mennyiségű mintákat vesznek, és azokat membránszűrőn (0,45 μm) szűrik át, az első (körülbelül) 20 ml-t kiöntve.

A szűrt mintát még aznap elemezni vagy bármilyen megfelelő módszerrel konzerválni kell, például 10 ml szűrlethez 0,05 ml 1 %-os higany-klorid- ($HgCl_2$) oldat hozzáadásával vagy 2–4 °C hőmérsékleten tárolva legfeljebb 24 órára, illetve – 18 °C hőmérsékleten hosszabb időszakra.

A felfuttatási időszak a vizsgált anyag hozzáadásával együtt nem haladhatja meg a hat hetet, az értékelési időszak viszont nem lehet rövidebb három hétnél, vagyis a végeredmény kiszámításához körülbelül 14–20 meghatározásnak kell rendelkezésre állnia.

Kapcsolt egység üzemmód

A két egység összekapcsolása úgy valósítható meg, hogy az iszapot is tartalmazó, kevert folyadék 1,5 literét naponta kicserélik a két egység aktivált iszapot tartalmazó levegőztetőedényben. Erősen abszorbeáló vizsgált anyagok esetén csak másfél liter felülúszót vesznek le az ülepítőedényekből, és a másik egység aktivált iszapot tartalmazó edényéhez töltik.

1.6.2.3. Elemzés

Az anyag viselkedésének nyomon követésére kétféle elemzést végezhetnek:

DOC és COD

A DOC-koncentráció-meghatározásokat kettesével végzik szénelemzővel és/vagy a szakirodalom 2. hivatkozásában megadottak szerint a COD-értékek meghatározásával.

Specifikus analízis

Alkalmas analitikai módszerrel meghatározzák a vizsgált anyag koncentrációit. Ha lehetséges, azt is meg kell határozni, milyen mértékben abszorbeálódik az anyag az iszapban.

2. ADATOK ÉS ÉRTÉKELÉS

2.1. Kapcsolt egység üzemmódban

Ha a „kapcsolt egység üzemmódot” használjuk, a napi elvonás fokát (DR) az 1.2.1. pontnak megfelelően számítják ki.

Az említett DR napi elvonási értéket háromórás átlagos visszatartási idő esetén a [2], határás átlagos visszatartási idő esetén pedig a [3] képlet segítségével az átoltási folyamat anyagátvitelének figyelembevétele érdekében DRc-re korrigáljuk.

$$DRc = \frac{8}{7} DR - \frac{100}{7} \quad [2]$$

$$DRc = \frac{4}{3} DR - \frac{100}{3} \quad [3]$$

A DRc-értékek sorozatának átlagát, továbbá a normál szórást a [4] képlet szerint számítják ki:

$$s_{DRc} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} \left(D\overline{R} - DRc_i\right)^2}{n - 1}} \quad [4]$$

ahol

S_{DRc} = a DRc-értékek sorozatának normál szórása,

$D\overline{R}$ = a DRc-értékek átlaga,

n = a meghatározások száma.

A DRc-terület szóróértékeit 95 %-os valószínűséggel a megfelelő statisztikai eljárással kiküszöbölik, pl. Nalimov-módszerrel (6), majd az átlagot és a normál szórást ismét kiszámítják a szórásmentes DRc-adatokra is.

A végeredményt az [5] képlet alapján a következőképpen számítják ki

$$DRc = D\overline{R} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}\, s_{DRc}} \quad [5]$$

ahol

$t_{n-1;\alpha}$ = a t táblázati értéke n számú E és EO értékpárra P (P = 1 – α) statisztikaikonfidencia-szinten, ahol P 95 %-on áll (1).

Az eredményt 95 %-os valószínűséggel, az átlagértékkel és a tűréshatárokkal fejezik ki, a hozzá tartozó normál szórással és a szórásmentes DRc-adatsor adatainak számával, pl.

DRc = 98,6 ± 2,3 % DOC-csökkenés,

s = 4,65 % DOC-csökkenés,

n = 18,

x = szóróértékek száma.

2.2. **Nem kapcsolt üzemmód**

Az egységek teljesítménye a következőképpen ellenőrizhető:

$$\text{COD- vagy DOC- eltávolítási \%} = \frac{\text{szennyvíz- COD vagy – DOC – kifolyás – COD vagy – DOC}}{\text{szennyvíz- COD vagy – DOC}} \times 100$$

E napi eltávolítási arányok grafikus formában ábrázolhatók a tendenciák – például az akklimatizáció – kifejezésre juttatása érdekében.

2.2.1. *COD/DOC-meghatározások használata*

A DR napi eltávolítási arányt az 1.2.1. pont szerint számítják ki.

Kiszámítják a DR értékek sorozatának középértékét; ezenkívül kiszámolják a normál szórást, a következőképpen:

$$s_{DR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} \left(D\overline{R} - DR_i\right)^2}{n - 1}} \quad [6]$$

ahol:

S_{DR} = a DRI-értékek sorozatának normál szórása,

$D\overline{R}$ = a DRI-értékek átlaga,

n = meghatározások száma.

A DR-terület szóró értékeit 95 %-os valószínűséggel megfelelő statisztikai eljárással kiküszöbölhetik, pl. Nalimov-módszerrel (6), majd az átlagot és a normál szórást ismét kiszámítják a szórásmentes DR-adatokra is.

A végeredményt a [7] képlettel a következőképpen számítják ki:

$$DR = D\overline{R} \pm \frac{t_{n-1};\alpha}{\sqrt{n}\, s_{DR}} \quad [7]$$

ahol:

$t_{n-1;\alpha}$ = a t táblázati értéke n számú E és E0 értékpárra P (P = 1 – α) statisztikai konfidenciaszinten, ahol P 95 %-on áll (1).

Az eredményt 95 %-os valószínűség mellett az átlagértékkel és a tűréshatárokkal fejezik ki, a hozzá tartozó normál szórással és a szórásmentes DR-adatsor, valamint a szórás adatainak számával, pl.

DR = (98,6 ± 2,3) % DOC-csökkenés,

s = 4,65 % DOC-csökkenés,

n = 18,

x = a szóró értékek száma.

2.2.2. *A specifikus analízis alkalmazása*

A vizsgált anyag vizes fázisban való eliminálódásának százalékos értékét (R_w) az 1.2.2. pont szerint számítják ki.

3. ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– a 3. függelékben megadott űrlapot, amely bemutatja a vizsgálat üzemeltetési feltételeit,

– a választott készüléket (OECD-megerősítési vizsgálat vagy lyukacsos edény),

– a választott üzemmód: kapcsolt egységek vagy nem kapcsolt egységek,

– szennyvíz leírása: szintetikus vagy kommunális – kommunális szennyvíz esetén a mintavétel kelte és helye,

– inokulum fajtája, a mintavétel kelte és helye,

– specifikus elemzések esetén az alkalmazott módszer megnevezése és annak ismertetése,

– a COD vagy DOC eltávolításának sebessége az idő függvényében, beleértve a felfuttatási és értékelési időszakot,

– a vizsgált anyag analitikai visszanyerése COD vagy DOC formájában a törzsoldatból,

– ha specifikus elemzésekre került sor, a vizsgált anyag vizes fázisban való bomlásának ábrázolása százalékban, az idő függvényében a felfuttatási és értékelési időszakban,

– a vizsgált anyag COD- és DOC-értékének átlagos csökkenését, valamint a normál szórást az értékelési időszak eredményéből számítják ki, azaz, amikor már a vizsgált anyag bomlása állandó értéket ér el, vagy folyamatos működési időszak következett be,

– az aktivált szennyvíziszap koncentrációjának alakulása az idő függvényében,

– az aktivált iszapra vonatkozó bármely megjegyzés és megfigyelés (a felesleges iszap eltávolítása, ömlesztés jelenléte, $FeCl_3$ stb.),

– az anyag vizsgálathoz használt koncentrációja,

– az iszap elemzésével kapott eredmények,

– a vizsgált anyag és – ha használtuk – a referenciaanyag vizsgálati eredményei és az összes információ,

– az eljárásban alkalmazott változtatások tudományos indokolása.

3.2. **Az eredmények értelmezése**

Ha a vizsgált anyag mennyisége nem vagy csak alig csökken a vizes fázisban, annak oka lehet az is, hogy a vizsgált anyag gátolja a mikroorganizmusokat. Ezt az iszap szétesése és vesztesége is jelzi, zavaros felülúszót eredményezve, illetve a COD vagy DOC eltávolítási hatékonyságának csökkenése az elővizsgálati berendezésben.

Bizonyos esetekben a fizikokémiai felszívódás is szerepet játszhat. A molekula biológiai lebomlása és a fizikokémiai adszorpció közötti különbség feltárható, ha deszorpció után elemzik az iszapot.

További vizsgálatokra van szükség, ha az adszorpciót és a tényleges (vagy részleges) biológiai bomlást el akarják különíteni.

Ezt számos módon el lehet végezni, de ezek közül a legmeggyőzőbb az, ha a felülúszót vagy az iszapot használják fel egy alapvizsgálathoz (lehetőleg egy aspirációs vizsgálathoz).

Ha magas DOC-, illetve COD-csökkenést észlelnek, akkor az a biológiai lebonthatóság következménye, ám alacsony eltávolítás esetén a biológiai lebonthatóság nem különböztethető meg az eliminációtól és az adszorpciótól. Ha például egy oldható vegyület igen magas, 98 %-os felszívódási együtthatót mutat, és a felesleges iszaphulladék napi 10 %, az elimináció 40 % is lehet, míg ha a felesleges iszap kiöntött mennyisége 30 %, akkor az elimináció az adszorpció-többletiszap eltávolítása miatt 65 %-ra is nőhet (4).

Specifikus analízis esetén figyelemmel kell lenni az anyag kémiai szerkezete és az alkalmazott specifikus analízis közötti viszonyra. Ez esetben a megfigyelt jelenséget nem értelmezhetjük úgy, mint az anyag mineralizációját.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

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.

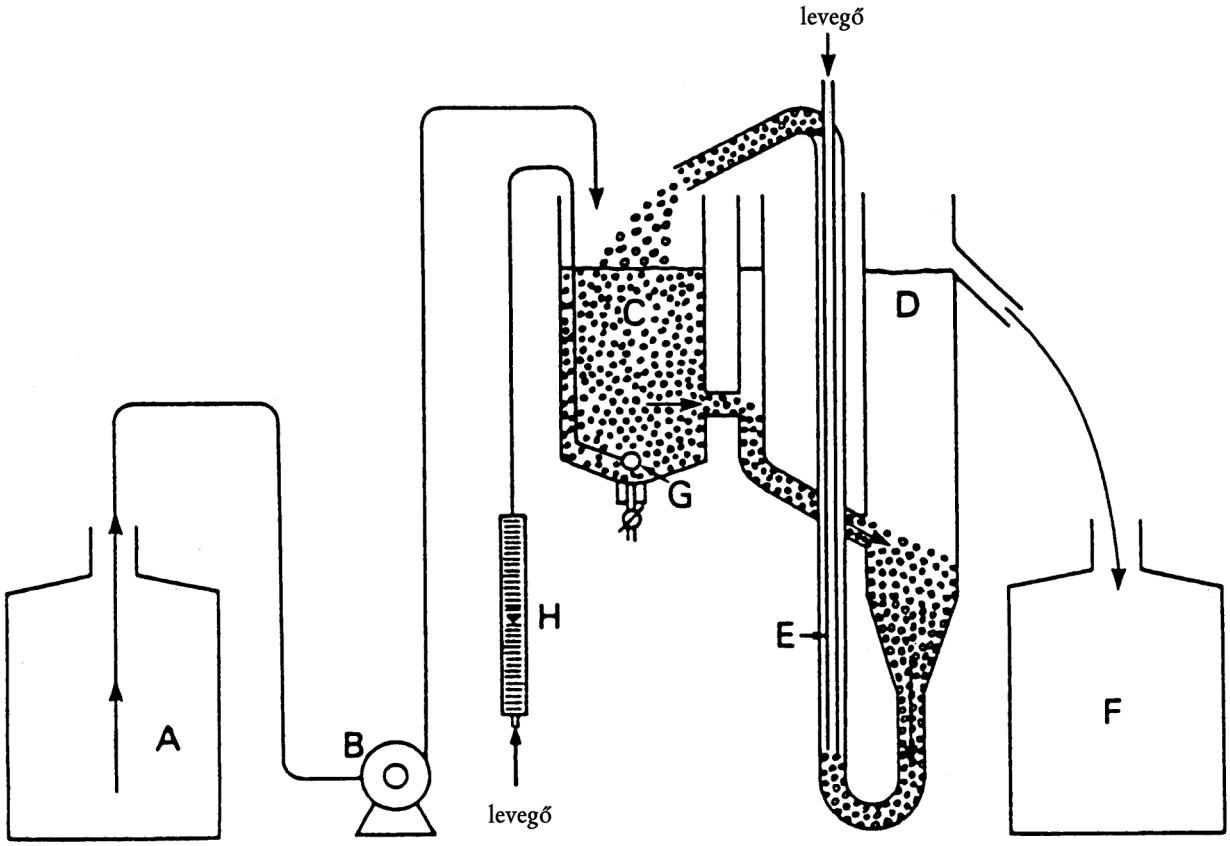
4. Wierich, P., Gerike, P., The fate of soluble, recalcitrant, and adsorbing compounds in activated sludge plants, *Ecotoxicology and Environmental Safety,* vol. 5, No 2, June 1981, pp. 161 to 171.

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.

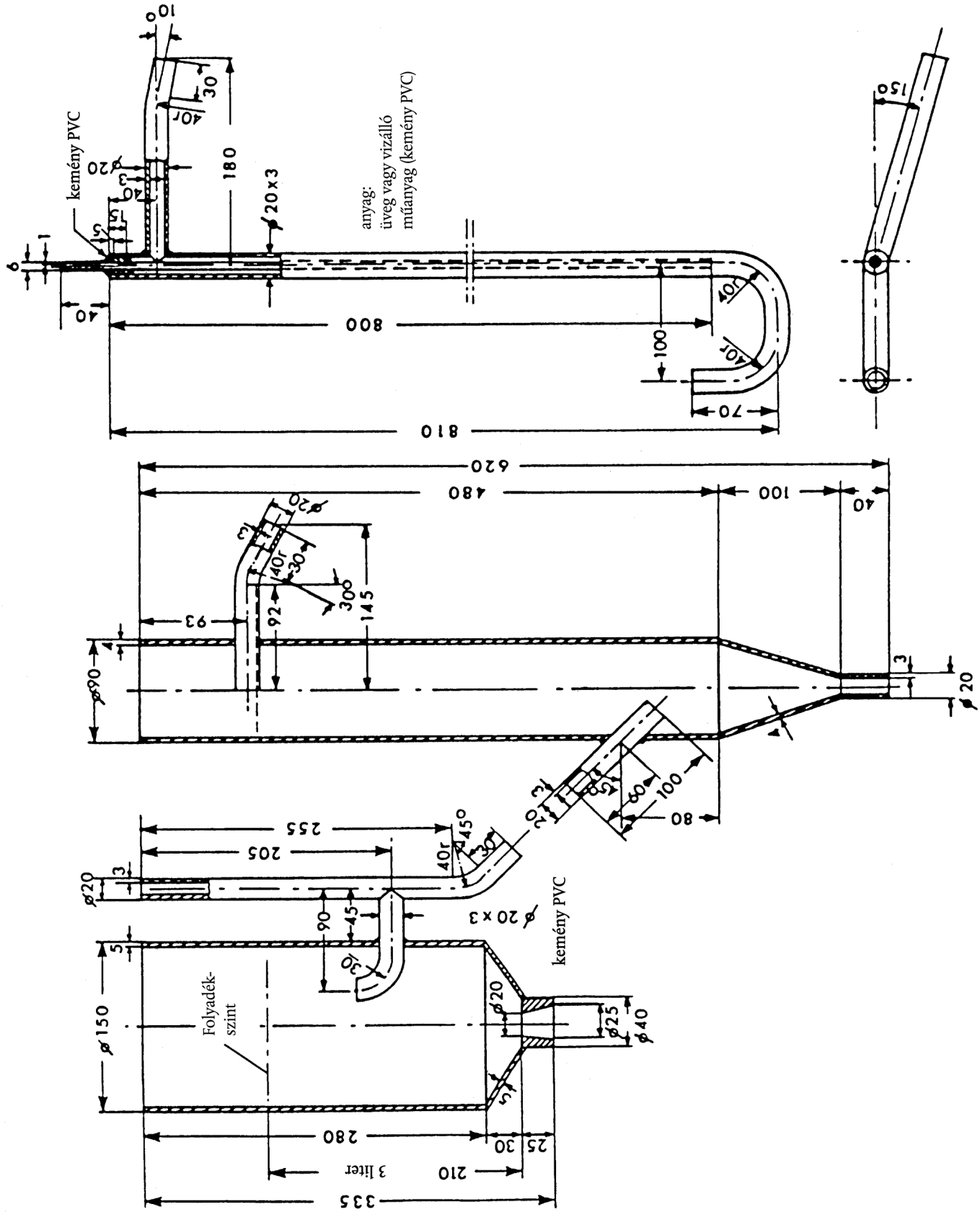
1. Függelék

1. ábra



Jelek: A: tároló;
B: adagoló eszköz;
C: levegőztető kamra (31 űrtartalom);
D: ülepítő edény;
E: légpumpa;
F: kollector;
G: levegőztető;
H: légáramlás mérő (választható).

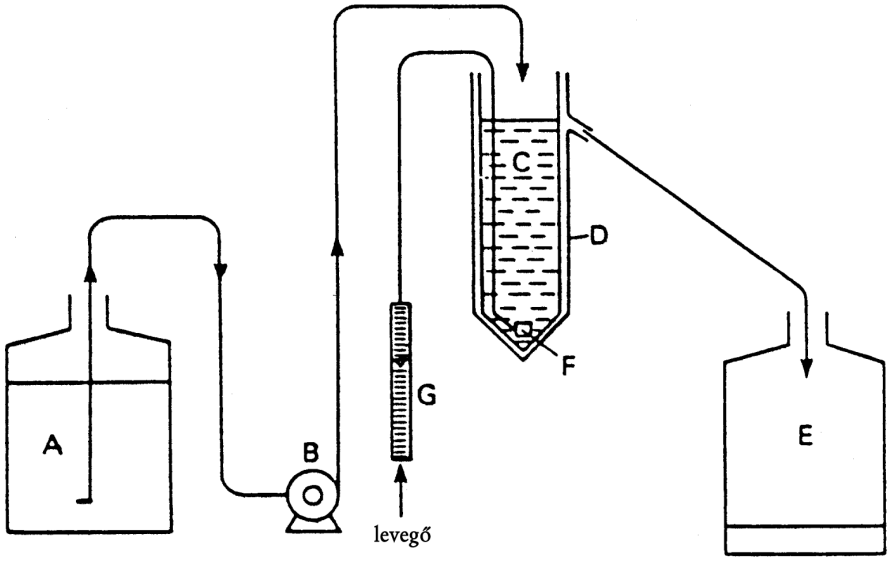
2. ábra


kemény PVC
anyag:
üveg vagy vizálló
műanyag (kemény PVC)
Folyadék-
szint
3 liter
kemény PVC

2. Függelék

1. ábra

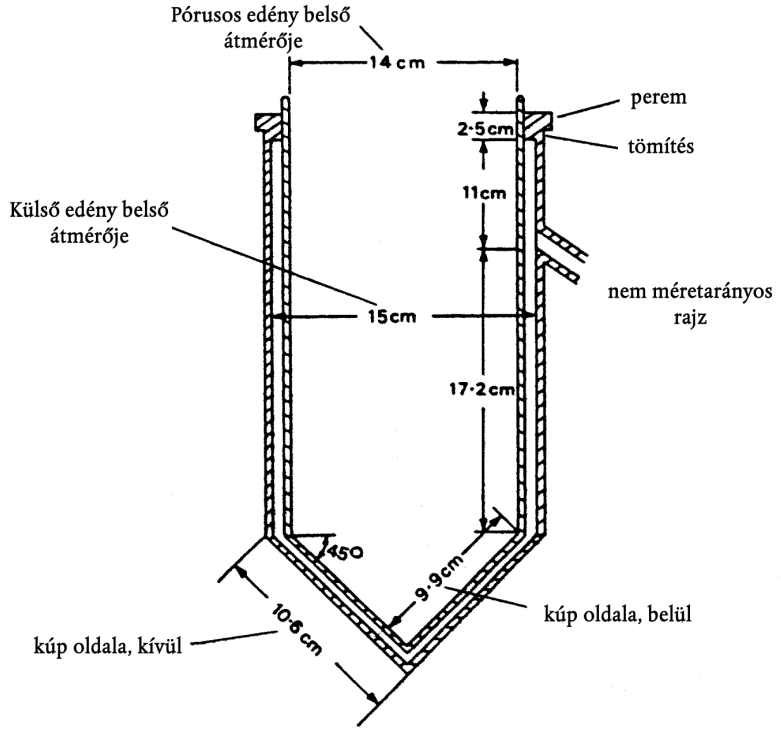
A biológiai lebonthatóság értékelésére szolgáló készülék



Jelek: A: tároló edény;
B: adagoló szivattyú;
C: pórusos levegőztető kamra;
D: külső áthatolhatatlan edény;
E: kifolyó gyűjtőedény;
F: diffúzos levegőztető;
G: rotaméter (választható).

2. ábra

A három literes lyukacsos levegöztetö edény részletes rajza



3. *Függelék*

Az aktivált iszap szimulációs vizsgálatának üzemeltetési feltételei

Minden csoportban ellenőrizni kell!

Készülék

OECD-megerősítési ☐
Lyukacsos edény ☐

Üzemmód

Egyetlen egység ☐
Kapcsolt egységek ☐
Nem kapcsolt egységek ☐

Átoltás

Nincs ☐
Aktivált iszap ☐
Felülúszó ☐

Átlagos visszatartási idő

Három óra ☐
Hat óra ☐

Alap-táptalaj

Kommunális szennyvíz ☐
Szintetikus szennyvíz ☐

Inokulum

Másodlagos kifolyás ☐
Összetett ☐
Aktivált iszap ☐

A vizsgált anyag hozzáadása

Kezdettől ☐
Fokozatosan emelkedve ☐
Miután az aktív iszap kialakult ☐

Elemzés

Specifikus ☐
COD ☐
DOC ☐

BIOLÓGIAI LEBONTHATÓSÁG

ELEVENISZAP-LÉGZÉSGÁTLÁSI VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

A módszerrel úgy mutatható ki valamely vizsgált anyag hatása a mikroorganizmusok működésére, hogy meghatározott körülmények között a vizsgált anyag különböző koncentrációinak jelenlétében mérik a légzés sebességét.

A módszer célja, hogy gyors szűrést tegyen lehetővé a mikrobiológiai szennyvízkezelő telepeket hátrányosan érintő anyagok azonosítására, és jelezze, hogy melyek azok a koncentrációk, amelyek még nem gyakorolnak gátló hatást a biológiai lebonthatóságot vizsgáló kísérletekben.

A meghatározó vizsgálatot megelőzheti egy dózisbehatároló vizsgálat. Ezzel tájékozódunk arról a koncentrációtartományról, amelyet a meghatározó vizsgálat során használnunk kell.

A vizsgálati protokoll tartalmaz két kontrollt is, vizsgált anyag nélkül, egyet a vizsgálati sor elején, egy másikat pedig a végén. Az aktivált iszappal végzett minden vizsgálatot referenciaanyaggal is ellenőrizhetjük.

A módszert leginkább olyan anyagoknál lehet alkalmazni, amelyek vízoldékonyságuk és alacsony illékonyságuk miatt nagy valószínűséggel a vízben maradnak.

A vizsgálati közegben csak korlátozottan oldódó anyagok esetében nem biztos, hogy meghatározható az EC_{50}.

Az oxigén felvételén alapuló eredményekből téves következtetéseket vonhatnak le akkor, ha a vizsgált anyag hajlamos az oxidatív foszforiláció szétkapcsolására.

A vizsgálat elvégzésekor hasznos tudnivalók a következők:

– vízoldékonyság,

– páranyomás,

– szerkezeti képlet,

– a vizsgált anyag tisztasági foka.

Ajánlás

Az aktivált iszap esetlegesen patogén mikroorganizmusokat is tartalmaz, ezért kellő óvatossággal kell kezelni.

1.2. Fogalommeghatározások és mértékegységek

A légzési sebesség a szennyvízben található mikroorganizmusok oxigénfogyasztásának üteme aerob iszapban, amelyet rendszerint mg O_2/mg iszap/óra mértékegységben fejezik ki.

Az adott anyag egy bizonyos koncentrációnál kifejtett gátló hatásának kiszámításához a légzési sebességet a két kontrollban mért légzési sebesség átlagának százalékában fejezik ki:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{Rc_1 + Rc_2}\right) \times 100 = \text{Százalékos gátlás}$$

ahol:

Rs = az oxigén fogyásának sebessége a vizsgált anyag vizsgált koncentrációja mellett,

Rc1 = az oxigén fogyásának sebessége az 1. kontrollnál,

Rc2 = az oxigén fogyásának sebessége a 2. kontrollnál.

Az EC50 e módszer szerint a vizsgált anyagnak az a koncentrációja, amelynél a légzési sebesség a módszerben ismertetett körülmények mellett a kontrollban mérhetőnél 50 %-kal kevesebb.

1.3. **Referenciaanyagok**

Referenciaanyagként a 3,5-diklór-fenol, mint ismert légzésgátló anyag használatát javasolják, ezt kell az aktivált iszap minden sorozata esetében az EC_{50}-érték szempontjából vizsgálni, így ellenőrizve, hogy az iszap érzékenysége nem rendellenes-e.

1.4. **A vizsgálati módszer alapelve**

Szintetikus szennyvíz szabványos mennyiségeivel összekevert aktivált iszap légzési sebességét mérik harmincperces és/vagy háromórás érintkezési időt követően. Ugyanezen aktivált iszapnak a vizsgált anyag különféle koncentrációinak jelenlétében is megmérik a légzési sebességét minden más szempontból azonos feltételek mellett. A vizsgált anyag egy bizonyos koncentrációnál kifejtett gátló hatását a két kontrollban mért légzési sebesség átlagának százalékában fejezik ki. Az EC_{50}-értéket a különféle koncentrációknál mért meghatározások alapján számítják ki.

1.5. **Minőségi követelmények**

A vizsgálatok eredményei akkor érvényesek, ha:

– a két kontroll-légzésisebesség 15 %-nál jobban nem tér el egymástól,

– a 3,5-diklór-fenol hozzáadása mellett mért EC_{50-} (harmincperces és/vagy háromórás) érték az általánosan elfogadott 5–30 mg/liter tartományban van.

1.6. **A vizsgálati módszer leírása**

1.6.1. *Reagensek*

1.6.1.1. A vizsgált anyag oldatai

A vizsgált anyag oldatait a törzsoldatból frissen készítik el a vizsgálat kezdetekor. Ha az alábbiakban ajánlott eljárást követik, a törzsoldat megfelelő koncentrációja 0,5 g/liter.

1.6.1.2. A kontrollanyag oldatainak elkészítése

A 3,5-diklór-fenol oldatát például elkészíthetik 0,5 g 3,5-diklór-fenol 10 ml 1 M-os NaOH-oldatban történő feloldásával, amelyet desztillált vízzel tovább hígítanak megközelítőleg 30 ml-re, majd állandó keverés közben 0,5 M H_2SO_4-oldatot adnak hozzá a kicsapódási pontig – ehhez körülbelül 8 ml 0,5 M H_2SO_4-re lesz szükség – és végül a keverék mennyiségét desztillált vízzel egy literre egészítik ki. Az oldat pH-ja ekkor 7 és 8 között kell, hogy legyen.

1.6.1.3. Szintetikus szennyvíz

Szintetikus szennyvíz előállításakor az alábbi anyagok megadott mennyiségeit oldják egy liter vízben:

– 16 g pepton,

– 11 g húskivonat,

– 3 g karbamid,

– 0,7 g NaCl,

– 0,4 g $CaC1_2.2H_2O$,

– 0,2 g $MgSO_4.7H_2O$,

– 2,8 g K_2HPO_4.

1. megjegyzés: A szintetikus szennyvíz „A szintetikus detergensekben használt felületaktív anyagok biológiai lebonthatóságának meghatározásához javasolt módszer” című OECD-műszaki jelentésben megadott recept százszoros koncentrátuma (1976. június 11.), dikálium-hidrogén-foszfáttal kiegészítve.

2. megjegyzés: Ha az elkészített oldatot nem használják fel azonnal, sötét helyen 0–4 °C közötti hőmérsékleten egy hétnél nem tovább lehet tárolni, olyan körülmények között, amelyek nem okoznak változást az oldat összetételében. A tárolás előtt a közeget sterilizálhatják, vagy a peptont és a húskivonatot csak kevéssel a vizsgálatok megkezdése előtt adják hozzá. Használat előtt az oldatot össze kell keverni, és a pH-ját be kell állítani.

1.6.2. *Készülék*

Mérőberendezés: A készülék formája nem döntő jelentőségű. A folyadék felszíne felett azonban levegőt kell hagyni, és a mérőfejnek pontosan illeszkednie kell a mérőlombik nyakára.

Szokásos laboratóriumi berendezésekre van szükség, és különösen a következőkre:

– mérőberendezés,

– levegőztetőkészülék,

– pH-elektród és -mérő készülék,

– O_2-elektród.

1.6.3. *Az inokulum előkészítése*

A vizsgálathoz mikrobás inokulumként főleg kommunális szennyvizet kezelő szennyvíztisztító telepről származó aktivált szennyvíziszapot használnak.

Szükség esetén a laboratóriumba való visszatéréskor rövid ideig, például 15 percig tartó ülepítéssel a szennyvíziszapból a durva részecskék eltávolíthatók, majd a felhasználás előtt kidobják a felső rétegben található, finomabb szemcsés, szilárd anyagot. Az iszap azonban össze is keverhető néhány másodperces keveréssel.

Ezenkívül, feltételezve, hogy gátló anyag is jelen lehet, az iszapot csapvízben és izotóniás oldatban ki kell mosni. Centrifugálás után a felülúszót kidobják (ezt az eljárást háromszor kell megismételni).

Az iszap kis mennyiségének megmérik a súlyát, és megszárítják azt. Ebből az eredményből kiszámítható a nedves iszapnak az a mennyisége, amelyet vízben szuszpendálni kell ahhoz, hogy a kevert folyadékban olyan aktivált iszap jöjjön létre, amelynek szuszpendált szilárdrészecske-tartalma 2–4 g/liter között van. E szint a vizsgálati közegben 0,8–1,6 g/liter közötti koncentrációt eredményez, ha az alábbiakban ajánlott eljárást követik.

Ha az iszapot a begyűjtés napján nem tudják felhasználni, minden literjéhez 50 ml szintetikus szennyvizet adnak, amelyet a fentebb leírtak szerint készítettek el; ezt azután egy éjszakán át 20 ± 2 °C hőmérsékleten levegőztetik. A levegőztetést addig folytatják, amíg a nap folyamán sor nem kerül a felhasználásra. Használat előtt ellenőrzik a pH-t, és szükség esetén 6–8 közötti értékre állítják be. A kevert folyadékban a szuszpendált szilárd részecskék mennyiségét az előző bekezdésben foglaltak szerint kell megállapítani.

Ha ugyanazt az iszapminta-sorozatot további napokon is fel kell használni (legfeljebb négy napig), minden munkanap végén további 50 ml szintetikus szennyvizet adnak az iszap minden literjéhez.

1.6.4. *A kísérlet végrehajtása*

Időtartam/érintkezési idő:	30 perc és/vagy három óra, amely alatt folyamatosan levegőztetni kell
Víz:	ivóvíz (szükség esetén klórmentesített)
Levegőellátás:	tiszta, olajmentes levegő. Légáram 0,5–1 liter/perc
Mérőberendezés:	lapos fenekű lombik, például BOD-lombik
Oxigénmérő:	megfelelő oxigénelektród, regisztrálókészülékkel
Tápanyagoldat:	szintetikus szennyvíz (lásd fentebb)
Vizsgált anyag:	a vizsgált oldatot a vizsgálat kezdetekor frissen kell elkészíteni
Referenciaanyag:	pl. 3,5-diklór-fenol (legalább 3 koncentrációban)
Kontrollok:	inokulumot tartalmazó minta, a vizsgált anyag nélkül
Hőmérséklet:	20 ± 2 °C.

A háromórás érintkezési időre a vizsgált anyagra és a referenciaanyagra egyaránt javasolt vizsgálati eljárást az alábbiakban ismertetik:

Több edényt (például egyliteres főzőpoharakat) használnak.

Legalább öt koncentrációt használnak, amelyek egymástól egy állandó 3,2-szeres tényezőnél jobban nem különböznek.

Induláskor a nulladik percben a szintetikus szennyvíz 16 ml-ét vízzel 300 ml-re hígítják. Ehhez 200 ml mikrobás inokulumot adnak, majd a teljes keveréket (500 ml) beleöntik az első edénybe (első kontroll C_1).

A vizsgálati edényt folyamatosan levegőztetik annak biztosítására, hogy az oldott O_2-tartalom soha ne essen 2,5 mg/liter alá, és hogy a légzési sebesség mérését közvetlenül megelőzően az O_2 koncentrációja legalább 6,5 mg/liter legyen.

A tizenötödik percben (a 15 perc önkényesen választott, de megfelelő hosszúságú intervallum) a fentieket megismétlik, azzal a különbséggel, hogy most a vizsgált anyag törzsoldatának 100 ml-ét adják a 16 ml szintetikus szennyvízhez, mielőtt azt vízzel 300 ml-re kiegészítenék, és hozzáadnák a mikrobás inokulumot az 500 ml teljes térfogatig. E keveréket azután egy második edénybe öntik, és a fentiek szerint levegőztetik. Az eljárást a vizsgált anyag törzsoldatának különböző koncentrációival 15 percenként megismétlik, ami által a vizsgált anyag különböző koncentrációi fognak rendelkezésünkre állni. Végül elkészítenek egy második kontrollt (C_2).

Három óra elteltével a pH-t feljegyzik, és az első edény alaposan elkevert tartalmát beleöntik a mérőberendezésbe, majd legfeljebb 10 percen keresztül mérik a légzési sebességet.

A meghatározást 15 perces időközökben a többi edény tartalmával megismétlik úgy, hogy az érintkezési idő minden edényben három óra legyen.

A referenciaanyagot minden mikrobásinokulum-sorozat esetében azonos módon vizsgálják.

Ettől eltérő eljárást kell alkalmazni, például egynél több oxigénmérőre lesz szükség akkor, ha a méréseket 30 perces érintkezési idő után akarják elvégezni.

Ha a kémiai oxigénigény mérésére van szükség, további edényeket készítenek elő, amelyek tartalmazzák a vizsgált anyagot, a szintetikus tápoldatot, valamint vizet, de nincs bennük aktivált iszap. Az oxigénigényt 30 perces és/vagy háromórás (érintkezési idő) levegőztetés után mérik, és feljegyzik.

2. ADATOK ÉS ÉRTÉKELÉS

A légzési sebességet a rögzítőkészülék nyomvonalából számítják, megközelítőleg 6,5 mg O_2/liter és 2,5 mg O_2/liter között, vagy 10 perces időszak alatt, amikor a légzési sebesség lassú. A légzési görbének az a része, amely alatt a légzési sebességet mérjük, lineáris kell, hogy legyen.

Ha a két kontroll légzési sebessége között 15 %-nál nagyobb az eltérés, vagy ha a referenciaanyag EC_{50}-értéke (30 perces és/vagy háromórás) nincs az elfogadott tartományon belül (5–30 mg/liter között 3,5-diklórfenolnál), a vizsgálatot érvénytelennek kell tekinteni, és meg kell ismételni.

A százalékos gátlást minden egyes vizsgálati koncentrációra kiszámítják (lásd az 1.2. pontot). A százalékos gátlást normál logaritmusos papíron vagy log-probit papíron a koncentráció függvényében ábrázoljuk, és így számítjuk ki az EC_{50}-értéket.

Az EC_{50}-értékek 95 %-os konfidenciaszintjét a szabványos eljárásokkal határozhatjuk meg.

3. ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– vizsgált anyag: kémiai azonosítási adatok,

– vizsgálati rendszer: az aktivált iszap forrása, koncentrációja és esetleges előzetes kezelése,

– vizsgálati körülmények:

  – a reakcióelegy pH-ja a légzési mérés előtt,

  – vizsgálati hőmérséklet,

  – vizsgálat időtartama,

  – referenciaanyag és mért EC_{50}-es értéke,

  – abiotikus oxigénfelvétel (ha van).

– eredmények:

  – valamennyi mért adat,

  – gátlási görbe és az EC_{50} kiszámításának módja,

  – EC_{50} és – ha lehetséges – a 95 %-os konfidenciahatárok, EC_{20}- és EC_{80}-értékek,

  – minden megfigyelés és minden eltérés a vizsgálati módszertől, amely az eredményeket befolyásolhatta.

3.2. Az adatok értelmezése

Az EC_{50}-értéket úgy kell tekinteni, mint amely csupán iránymutatást jelent a vizsgált anyag esetleges vagy valószínű toxicitásának megítéléséhez akár az aktivált iszappal végzett szennyvízkezelés, akár a szennyvízben jelen lévő mikroorganizmusok tekintetében, hiszen a tényleges környezetben előforduló, igen bonyolult kölcsönhatásokat laboratóriumi vizsgálatokkal nem lehet pontosan utánozni. Ezenkívül az olyan típusú vizsgált anyag, amely az ammónia oxidációját gátolja, szintén adhat atipikus gátlási görbét. Ezért az ilyen grafikonokat kellő óvatossággal kell értelmezni.

4. **HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM**

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.

BIOLÓGIAI LEBOMLÁS

MÓDOSÍTOTT SCAS-VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

1.1. Bevezetés

E módszernek az a célja, hogy felmérje a vízoldékony, nem illékony szerves anyagok végső biológiai lebontásának lehetőségeit akkor, ha azok statikus vizsgálati körülmények között nagy töménységű mikroorganizmusnak vannak kitéve. A mikroorganizmusok életképességét ezen időszak alatt ülepítettszennyvíz-tápoldat naponkénti hozzáadásával lehet fenntartani. (A hétvégi követelményekhez a szennyvizet 4 °C hőmérsékleten lehet tárolni. Másik megoldásként az OECD-megerősítési vizsgálat szintetikus szennyvizét is felhasználhatják.)

A szuszpendált szilárd részecskéken fizikokémiai adszorpció is létrejöhet, amit az eredmények értékelésekor figyelembe kell venni (lásd a 3.2. pontot).

A folyadékfázis hosszú visszatartási ideje (36 óra), valamint a tápanyagok szakaszos hozzáadása miatt a vizsgálat nem teljesen szimulálja a szennyvíztisztító telepen tapasztalható viszonyokat. A különféle vizsgált anyagokkal nyert eredmények azt jelzik, hogy a vizsgálati módszernek igen nagy a biológiai lebonthatósági potenciálja.

A vizsgálathoz előírt feltételek igen kedvezőek a vizsgált anyag lebontására képes mikroorganizmusok szelekciójához és/vagy adaptációjához. (Az eljárást más vizsgálatokhoz szükséges akklimatizált inokulum előállítására is felhasználhatják.)

E módszerben az oldott szerves szén koncentrációjának mérését használják a vizsgált anyag teljes biológiai lebonthatóságának meghatározására. A DOC-értéket kedvezőbb savanyítás és átszűrés után meghatározni, nem pedig a $C_{összes} - C_{szervetlen}$ különbségének értékeként.

A fenti módszer mellett párhuzamosan alkalmazott specifikus analitikai módszer segíthet az anyag primer lebomlásának értékelésében (a kiindulási molekulaszerkezet eltűnése).

A módszer csak olyan szerves vizsgált anyagokra megfelelő, amelyek(nek) a kísérletben használt koncentrációban:

– a vizsgálati körülmények között vízben oldódnak (literenként legalább 20 mg oldott szerves szén),

– páranyomása elhanyagolható,

– a baktériumokat nem gátolják,

– a vizsgálati rendszerben jelentős mértékben nem adszorbeálódnak,

– habképződés útján nem tűnnek el a vizsgált oldatból.

Meg kell határozni a vizsgált anyag szervesszén-tartalmát.

A vizsgált anyag főbb összetevői egymáshoz viszonyított részarányának ismerete hasznos lehet a kapott eredmények értékelése során, különösen azon esetekben, amikor az eredmények alacsony számértékűek vagy marginálisak.

Az anyag mikroorganizmusokra gyakorolt mérgező hatásának ismerete kívánatos az alacsony számértékű eredmények értékelésénél és a megfelelő vizsgálati koncentrációk kiválasztásánál.

1.2. Fogalommeghatározások és mértékegységek

C_T = a vizsgált anyag koncentrációja szerves szénben kifejezve a levegőztetési időszak kezdetén a szennyvízben jelen lévő, illetve ahhoz hozzáadott állapotban (mg/liter),

C_t = az oldott szerves szén mennyisége a vizsgált anyag felülúszó folyadékában a levegőztetési időszak végén (mg/liter),

C_c = az oldott szerves szén mennyisége a kontroll felülúszó folyadékában a levegőztetési időszak végén (mg/liter).

A biológiai lebonthatóság mértékét e módszerben a szerves szén eltűnésének arányában határozzuk meg. A biológiai lebonthatóságot az alábbiak szerint fejezhetjük ki:

1. A naponta hozzáadott anyag mennyiségére eső D_{da} százalékos eltávolítása:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \qquad [1]$$

ahol Dda = biológiai lebonthatóság/napi hozzáadott mennyiség.

2. Az egyes napok kezdetén jelen lévő anyag mennyiségére eső D_{ssd} százalékos eltávolítása:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t\,(i+1)} + 3C_{c\,(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2(a)]$$

$$= \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2(b)]$$

ahol Dssd = biológiai lebonthatóság/anyag mennyisége a nap elején;

az i és (i + 1) index a mérés napját jelzi.

A 2(a) képlet alkalmazása akkor ajánlott, ha a kifolyó vízben a DOC naponta változik, míg a 2(b) képletet inkább akkor használhatjuk, ha a kifolyó vízben a DOC viszonylag állandó szinten marad napról napra.

1.3. **Referenciaanyagok**

Egyes esetekben, ha új anyagokat vizsgálunk, hasznos lehet a referenciaanyagok alkalmazása; konkrét referenciaanyagokat azonban egyelőre nem tudunk ajánlani.

A körvizsgálatban értékelt számos vegyület adatait megadják az 1. Függelékben, azért, hogy a módszer kalibrálását időről időre el lehessen végezni, és az eredmények egybevethetőek legyenek akkor is, ha azokat más módszer alkalmazásával nyerték.

1.4. **A vizsgálati módszer alapelve**

Szennyvíztisztító telepről származó aktivált iszapot helyeznek egy félig folyamatos aktiváltiszap-egységbe (Semi-Continuous Activated Sladge unit = SCAS). Hozzáadják a vizsgált anyagot és az ülepített kommunális szennyvizet, majd a keveréket 23 órán keresztül levegőztetik. Ezután a levegőztetést leállítják, az iszapot ülepítik, és a felülúszó folyadékot eltávolítják.

A levegőztetőkamrában visszamaradó iszapot a vizsgált anyag és a kommunális szennyvíz további mennyiségével elkeverik, majd a ciklust megismétlik.

A biológiai lebonthatóságot a felülúszóban található oldott szerves szén mennyiségének meghatározásával állapítják meg. Ezt az értéket vetik egybe a csak ülepített szennyvízzel kezelt kontrollcsőben található folyadék hasonló értékével.

Ha specifikus analitikai módszert használunk, mérhető a kiindulási molekula koncentrációjának a biológiai bomlás következtében előállott változása is (elsődleges biológiai bomlás).

1.5. **Minőségi követelmények**

Az oldott szerves szén eltávolításán alapuló módszer reprodukálhatósága még nem került meghatározásra. (Az elsődleges bomlást tekintve, a nagymértékben bomló anyagokról igen pontos adatokat nyerhetünk.)

A módszer érzékenységét nagymértékben a kontrollértékek változékonysága és kisebb mértékben az oldott szerves szén, illetve a vizsgált vegyület folyadékkoncentrációjának az egyes ciklusok elején történő kimutatási pontossága határozza meg.

1.6. **A vizsgálati módszer leírása**

1.6.1. *Előkészületek*

Megfelelő mennyiségű tiszta levegőztetőedényt vagy az eredeti 1,5 literes, SCAS-vizsgálathoz használt egységet alkalmazhatják, amelybe beillesztik a levegőbeeresztő csöveket (1. ábra) minden, a vizsgált anyagot tartalmazó, illetve kontrolledény esetében. Vattaszűrőn áteresztett sűrített levegőt vezetnek a vizsgálati egységekbe, amely szerves szenet nem tartalmazhat, és amelyet előzetesen vízzel telíteni kell a párolgási veszteségek csökkentésére.

Literenként 1–4 gramm szuszpendált szilárd részecskét tartalmazó kevert folyadékot szereznek be egy főként kommunális szennyvizet kezelő tisztítóműből. A kevert folyadék mintegy 150 ml-ére van szükség minden egyes levegőztetőegységhez.

A vizsgált anyag törzsoldatait desztillált vízzel állítják elő; normális esetben a szükséges koncentráció 400 mg szerves szén/liter, ami a vizsgált vegyület 20 mg szén/liter koncentrációját eredményezi minden levegőztetési ciklus elején, ha biológiai bomlás nem történik.

Ennél nagyobb koncentrációk is megengedettek, ha a mikroorganizmusokra gyakorolt toxicitás lehetővé teszi.

A törzsoldat szervesszén-tartalmát meg kell mérni.

1.6.2. *Vizsgálati körülmények*

A vizsgálatot 20–25 °C közötti hőmérsékleten kell elvégezni.

Aerob mikroorganizmusok nagy koncentrációit használják (1–4 g/liter közötti szuszpendáltszilárdrészecske-tartalom), és a tényleges visszatartási idő 36 óra. A hozzáadott szennyvízben található széntartalmú anyagok rendszerint nyolc órával az egyes levegőztetési ciklusok megkezdését követően erőteljesen oxidálódnak. Ezt követően az iszap endogén módon lélegzik a levegőztetési időszak végéig, amely időszak alatt az egyetlen rendelkezésre álló szubsztrátum a vizsgált anyag, hacsak az is nem metabolizálódott. E jellemzők a keverék ismételt napi újraoltásával igen kedvező feltételeket teremtenek olyan esetekben, amikor kommunális szennyvizet használunk tápoldatként, mind az akklimatizáció, mind pedig a nagyfokú biológiai bomlás vizsgálatához.

1.6.3. *A kísérlet végrehajtása*

Kevert folyadékmintát vesznek egy főként háztartási szennyvizet kezelő tisztítóműből vagy laboratóriumi készülékből és azt a laboratóriumi felhasználásig aerob körülmények között tartják. A kevert folyadékból mintegy 150 ml-t töltenek be minden egyes levegőztetőegységbe, a vizsgált anyagot tartalmazó és a kontrollegységbe egyaránt (ha az eredeti SCAS-egységet használják, az említett mennyiségeket tízzel kell megszorozni), és megkezdik a levegőztetést. 23 óra elteltével a levegőztetést leállítják, és az iszapot 45 percen át ülepítik. Egymás után megnyitják az edények csapjait, és levesznek a felülúszó folyadékból 100 ml-t. Közvetlenül felhasználás előtt mintát vesznek az ülepített kommunális szennyvízből, és ebből 100 ml-t hozzáadnak az egyes levegőztetőegységekben maradt iszaphoz. Ezután ismét elkezdik a levegőztetést. E szakaszban még nem adnak vizsgált anyagot az iszaphoz, és az egységeket naponta táplálják a kommunális szennyvízzel egészen addig, míg az ülepítés után tiszta felülúszó folyadékot nem nyernek. Ez rendszerint legfeljebb két hetet vesz igénybe, amikorra a felülúszó folyadékban található oldott szerves szén mennyisége az egyes ciklusok elején valamely állandó érték felé közelít.

Ezen időszak végén az ülepített iszapokat összekeverik, és az eredményül kapott vegyes iszapból minden egységhez 50 ml-t adnak.

A kontrollegységhez 95 ml ülepített szennyvizet és 5 ml vizet adnak, míg a vizsgálati egységhez 95 ml ülepített szennyvíz mellé 5 ml-t adnak hozzá a vizsgált anyag megfelelő törzsoldatából (400 mg/liter). Ismét megkezdik a levegőztetést, és újabb 23 órán keresztül folytatják. Ezután az iszapot 45 percen át ülepítik, majd a felülúszót leszívják, és meghatározzák az oldottszervesszén-tartalmat.

A fenti feltöltés-leszívás eljárást naponta kell ismételni az egész vizsgálat folyamán.

Az ülepítés előtt szükség lehet az egység falának megtisztítására, hogy a szilárd részecskék ne gyűljenek össze a folyadék szintje fölött. A (keresztbe) szennyeződés megakadályozása érdekében minden egységnél külön kefét vagy kaparót kell használni.

Ideális esetben az oldott szerves szén mennyiségét a felülúszó folyadékban naponta határozzák meg, ám ennél kevésbé gyakori meghatározás is megengedhető. Elemzés előtt a folyadékot mosott, 0,45 μm-es membránszűrőn átszűrik, és centrifugálják. A membránszűrők akkor megfelelők, ha biztosítható, hogy nem bocsátanak ki szenet, és nem nyelnek el semmit a vizsgált anyagból a szűrés során. A minta hőmérséklete a centrifugában nem haladhatja meg a 40 °C-ot.

A biológiai úton csekély mértékben vagy egyáltalán nem bomló anyagok esetében a vizsgálat ideje meghatározhatatlan, de a tapasztalatok szerint legalább 12 és legfeljebb 26 hétnek kell lennie.

2. ADATOK ÉS ÉRTÉKELÉS

A vizsgálati egységekben, illetve a kontrollegységekben található felülúszó folyadék oldottszervesszén-mennyiségének értékét ábrázolják az idő függvényében.

A biológiai bomlás folyamatának előrehaladásával a vizsgálati anyagban található szint közelíti a kontrollszintet. Amikor a két szint közötti különbség három egymást követő mérés során állandónak bizonyul, olyan számú további mérést végeznek, amely elegendő a kapott adatok statisztikai feldolgozásához, és kiszámítják a vizsgált anyag százalékos biológiai lebonthatóságát (D_{da} vagy D_{ssd}, lásd az 1.2. pont).

3. ZÁRÓ VIZSGÁLATI JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek lehetőség szerint az alábbi információkat kell tartalmaznia:

– minden információ a használt szennyvíz típusáról, a felhasznált egységről, a vizsgált anyagra vonatkozó vizsgálati eredményekről, a referenciaanyagról – ha volt –, valamint a vakpróbáról,

– hőmérséklet,

– biológiai bomlási görbe, a kiszámítás módjának leírásával (lásd az 1.2. pontot),

– dátum és helyszín, ahonnan a vizsgálati organizmusok mintáját vettük, adaptációs állapotuk, koncentráció stb.,

– a vizsgálati eljárás lépéseiben történt bármely változtatás tudományos okai,

– aláírás és dátum.

3.2. Az eredmények értelmezése

Miután az ezzel a módszerrel vizsgálandó anyag biológiailag nem könnyen lebontható, a DOC kizárólag biológiai lebonthatóság révén való eltűnése rendes esetben fokozatosan, napok vagy hetek alatt játszódik le, kivéve azon eseteket, amikor a hirtelen akklimatizálódást néhány hét után az anyag átmenet nélküli eltűnése jelzi.

Bizonyos esetekben azonban a fizikokémiai felszívódás fontos szerepet játszhat; ezt az jelzi, ha rögtön az elején teljesen vagy részben eltűnik a hozzáadott DOC. Hogy ezt követően mi történik, az olyan tényezőkön múlik, mint az adszorpció mértéke vagy a szuszpendált szilárd részecskék koncentrációja a kiöntött kifolyó szennyvízben. A kontroll-, illetve a vizsgált anyagot is tartalmazó felülúszó DOC-koncentrációi közötti különbség rendszerint lassan emelkedik az eredeti alacsony értékről, és ez a különbség aztán meg is marad ezen az új értéken a vizsgálat további szakaszaiban, hacsak nem következik be akklimatizáció.

További vizsgálatokra van szükség, ha az adszorpciót és a tényleges (vagy részleges) biológiai bomlást el akarják különíteni. Ezt számos módon el lehet végezni, de a legmeggyőzőbb az, ha a felülúszót vagy az iszapot használják fel inokulumként egy alapbeállító vizsgálathoz (lehetőleg egy légzésmérő vizsgálathoz).

Az olyan típusú vizsgált anyagok, amelyek DOC-értékei ezen vizsgálatban gyorsan és nem felszívódás útján csökkennek, potenciálisan biológiailag lebonthatónak tekinthetők. A részleges és nem felszívódás útján történő csökkenés azt jelzi, hogy a vegyület legalább részben bomlik biológiailag.

Ha a DOC-érték nem vagy csak alig csökken, annak oka lehet az is, hogy a vizsgált anyag gátolja a mikroorganizmusokat, amit az is jelezhet, hogy az iszap szétesik és elvész, zavaros felülúszót eredményezve. Ilyenkor a vizsgálatot a vizsgált anyag alacsonyabb koncentrációjával kell megismételni.

A specifikus analitikai módszerek vagy a ^{14}C izotóppal jelölt vizsgált anyag használata nagyobb érzékenységet tesz lehetővé. Ha ^{14}C izotóppal jelölt vegyületet alkalmaznak, a biológiai bomlás tényét a $^{14}CO_2$ visszanyerési aránya fogja megerősíteni.

Ha az eredményeket elsődleges bomlás formájában is megadják, lehetőség szerint magyarázatot kell fűzni a kémiai szerkezet olyan jellegű változásához, amely a kiindulási vegyület reakciójának elmaradását okozza.

A vak vizsgálati közeg reakciója mellett az analitikai módszer hitelesítését is meg kell adni.

4. HIVATKOZOTT SZAKIRODALOM

1. OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 302 A*, Decision of the Council C(81) 30 final.

1. *Függelék*

SCAS-vizsgálat: az eredmény példái

Anyag	C_T (mg/l)	$C_t - C_c$ (mg/l)	Százalékos bomlás D_{da}	Vizsgálat időtartama (nap)
4-acetil-aminobenzén-szulfonát	17,2	2,0	85	40
tetra-propilén-benzol-szulfonát	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
dietilén-glikol	16,5	0,2	98,8	40
Aniline	16,9	1,7	95,9	40
ciklopentán-tetra-karboxilát	17,9	3,2	81,1	120

2. *Függelék*

A vizsgálati berendezés példája

1. ábra

