31988L0302

30.5.1988 ÚRADNÝ VESTNÍK EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV L 133/1

# SMERNICA KOMISIE

## z 18. novembra 1987,

## ktorou sa prispôsobuje technickému pokroku po deviatykrát smernica Rady 67/548/EHS o aproximácii zákonov, iných právnych predpisov a správnych opatrení týkajúcich sa klasifikácie, balenia a označovania nebezpečných látok

(88/302/EHS)

KOMISIA EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho hospodárskeho spoločenstva,

so zreteľom na smernicu Rady 67/548/EHS z 27. júna 1967 o aproximácii zákonov, iných právnych predpisov a správnych opatrení týkajúcich sa klasifikácie, balenia a označovania nebezpečných látok ([1]), v znení smernice 79/831/EHS ([2]) po šiestej zmene, a najmä na jej článok 19,

keďže článok 3 ods. 1 smernice 67/548/EHS ustanovuje, že fyzikálno-chemické vlastnosti, toxicita a ekotoxicita látok a prípravkov sa ustanoví podľa metód špecifikovaných v prílohe V;

keďže článok 3 ods. 2 smernice 67/548/EHS ustanovuje, že skutočné alebo potenciálne nebezpečenstvo pre životné prostredie sa hodnotí podľa vlastností stanovených v prílohách VII a VIII;

keďže príloha V tak, ako bola zavedená smernicou 84/449/EHS ([3]), obsahuje v súčasnej dobe iba skúšobné metódy pre vlastnosti uvedené v prílohe VII a je teda nevyhnutné opísať skúšobné metódy pre vlastnosti uvedené v prílohe VIII;

keďže opatrenia tejto smernice sú v súlade so stanoviskom Výboru na prispôsobovanie sa smerníc technickému pokroku pri odstraňovaní technických prekážok obchodu s nebezpečnými látkami a prípravkami,

PRIJALA TÚTO SMERNICU:

*Článok 1*

Text prílohy tejto smernice sa dopĺňa do prílohy V smernice 67/548/EHS.

*Článok 2*

Členské štáty prijmú a uverejnia opatrenia nevyhnutné na dosiahnutie súladu s touto smernicou najneskôr do 31. decembra 1988. Bezodkladne o tom informujú Komisiu. Tieto predpisy uplatnia najneskôr od 30. júna 1989.

*Článok 3*

Táto smernica je určená členským štátom.

V Bruseli 18. novembra 1987

*Za Komisiu*

STANLEY CLINTON DAVIS

*člen Komisie*

([1]) Ú. v. ES 196, 16.8.1967, s. 1/67.
([2]) Ú. v. ES L 259, 15.10.1979, s. 10.
([3]) Ú. v. ES L 251, 19.9.1984, s. 1.

*PRÍLOHA*

Nižšie opísané testovacie metódy slúžia na stanovenie niektorých toxických a ekotoxických účinkov uvedených v prílohe VIII smernice Rady 79/831/EHS. Sú tu opísané testovacie metódy vhodné pre stupeň 1 a stupeň 2 podľa prílohy VIII, nie sú však rozlíšené na jednotlivé stupne.

**OBSAH**

Strana

ČASŤ B: Metódy stanovenia toxicity ..... 4

Všeobecný úvod: Časť B ..... 4
Test subchronickej orálnej toxicity (po 90 - dňovom opakovanom orálnom vystavení u hlodavcov) ..... 8
Test subchronickej orálnej toxicity (po 90 - dňovom opakovanom orálnom vystavení u nehlodavcov) ..... 12
Štúdia subchronickej dermálnej toxicity (po 90 - dňovej opakovanej kožnej aplikácii u hlodavcov) ..... 16
Test toxicity subchronickej inhalácie (90 - dňový test opakovaného inhalačného vystavenia na hlodavcoch) .. 20
Test teratogenity – hlodavce a nehlodavce ..... 24
Test chronickej toxicity ..... 27
Test karcinogenity ..... 32
Kombinovaný test chronickej toxicity/karcinogenity ..... 37
Jednogeneračný reprodukčný test toxicity ..... 43
Dvojgeneračný reprodukčný test toxicity ..... 47
Toxikokinetika ..... 51
Testovanie mutagenity a karcinogenity ..... 55
— Génová mutácia – *Saccharomyces cerevisiae*..... 55
— Mitotická rekombinácia – *Saccharomycesc cerevisiae*..... 58
— Test génových mutácií buniek cicavcov *In vitro*..... 61
— Poškodenie a oprava DNA – neprogramovaná syntéza DNA – bunky cicavcov *in vitro*..... 64
— Test výmeny sesterských chromatíd *in vitro*..... 68
— Test na zachytenie recesívnych letálnych mutácií viazaných na pohlavie pri *Drosophila melanogaster*..... 71
— Testy bunkovej transformácie cicavčích buniek *in vitro*..... 73
— Dominantný letálny test u hlodavcov ..... 76
— Cytogenetika cicavčích zárodočných buniek *in vivo*..... 79
— Spot test u myší ..... 82
— Dedičná translokácia u myší ..... 85

ČASŤ C: Metódy na určovanie ekotoxicity ..... 88

Všeobecný úvod: Časť C ..... 88
Test inhibície na riasach ..... 89
Toxicita na dážďovkách: Umelopôdny test ..... 95
Biodegradácia: Zahn-Wellensov test ..... 99
Biodegradácia: Simulačné testy na aktivovanom kale ..... 106
Biodegradácia: Test respiračnej inhibície aktivovaného kalu ..... 118
Biodegradácia: Modifikovaný SCAS – test ..... 123

## ČASŤ B: METÓDY STANOVENIA TOXICITY

### VŠEOBECNÝ ÚVOD: ČASŤ B

DLHODOBÉ ŠTÚDIE

Štúdie subchronickej a chronickej toxicity a štúdie karcinogenity

**Charakterizácia testovanej látky a testovacej zmesi**

Zloženie testovanej látky, včítane hlavných prísad, a jej príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti, včítane stability, by mali byť známe pred začatím akejkoľvek štúdie toxicity.

Fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej látky ponúkajú dôležité informácie pre výber spôsobu podávania, pre návrh každej jednotlivej štúdie a pre manipuláciu s testovanou látkou a jej uchovávanie.

Údaje o chemickej štruktúre a fyzikálno-chemických vlastnostiach môžu tiež ponúknuť informáciu o absorpčných charakteristikách u plánovaného spôsobu dávkovania a o možnostiach metabolického spracovania a distribúcie látky v tkanivách. Môžu tiež existovať údaje o toxiko-kinetických parametroch z predchádzajúcich štúdií toxicity a z toxiko-kinetických štúdií.

Začiatku štúdie by mal predchádzať vývoj analytickej metódy pre kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie testovanej látky (pokiaľ možno včítane hlavných prísad) v dávkovacom médiu a v biologickom materiále.

**Pokusné zvieratá: výber druhu a kmeňa**

S ohľadom na to, že je nevyhnutné zvieratá vystaviť počas doby predstavujúcej väčšinovú časť dĺžky ich života, existuje tendencia obmedziť štúdie na relatívne krátko žijúce testovacie druhy nevyžadujúce zložitú opateru. Je vysoko žiaduce, aby bol známy spontánny výskyt ochorení a nádorov u kmeňov použitých zvierat, ak sa chovajú v porovnateľných podmienkach.

Kmene by mali byť dobre ocharakterizované a nesmú sa u nich vyskytovať nepriaznivé vrodené vady. V tomto ohľade má určitú výhodu použitie potomkov príbuzenského kríženia (inbredné kmene) alebo hybridov F1-generácie; ak sú však k dispozícii dostatočné údaje o pozadí outbredných kmeňov (nepríbuzenské kríženie), môžu byť použité tiež na zvieratách z definovaného zásobného chovu.

**Opatera zvierat, podávanie výživy a vody**

Testy a štúdie na zvieratách musia byť uskutočnené v súlade s vnútroštátnymi predpismi a musia byť pri nich zohľadnené humánne princípy a medzinárodný vývoj v oblasti ochrany zvierat.

Ak majú byť získané zmysluplné výsledky, je nevyhnutná prísna kontrola podmienok prostredia a adekvátna opatera zvierat. Faktory ako chovateľské podmienky, chronická choroba, medikamentózna liečba, prísady vo výžive, vzduchu, vode a stelivu a všeobecné podmienky chovu, môžu významne ovplyvniť výsledky štúdií pri opakovanej dávke. Všeobecne by mal byť známy účinok chemických sterilizačných prostriedkov na štúdiu.

Krmivo musí spĺňať všetky požiadavky na výživu testovaného druhu a nesmie obsahovať prísady, ktoré by mohli mať vplyv na výsledky testov. Hlodavce musia byť zásobované potravou a vodou *ad libitum*, pričom im musí byť potrava vymieňaná najmenej raz do týždňa. V súčasnosti sa používajú tri typy krmív: bežné krmivo, syntetické krmivo a rôzne druhy špeciálne zloženého krmiva.

Bez ohľadu na zvolený typ krmiva musia dodávatelia periodickým sledovaním zaručiť nutričnú hodnotu a obsah kontaminujúcich látok v základnej strave a musia tieto informácie ponúknuť laboratóriu pri každej šarži potravy. Je vysoko žiaduce, aby boli známe účinky potravného režimu na metabolizmus a vznik nádorov a dĺžku života.

Okrem toho môže skúšobné laboratórium uskutočňovať kontrolné analýzy výživy na zložky krmiva i nežiaduce prímesi, včítane karcinogénov. Ak sa také analýzy uskutočňujú, ich výsledky sa archivujú a uvedú sa v záverečnej správe o každej testovanej látke.

Bežné zložky výživy, o ktorých je známe, že vplývajú na karcinogenézu (napr. antioxidačné látky, nenasýtené mastné kyseliny, selén), nesmú byť prítomné v nepriaznivých koncentráciách. Možný vplyv radu známych kontaminujúcich látok obsiahnutých vo výžive na posúdenie karcinogenity vyžaduje, aby bola u krmiva venovaná zvláštna pozornosť prítomnosti zvyškov pesticídov, organochlórových zlúčenín, polycyklických aromatických uhľovodíkov, estrogénov, ťažkých kovov, nitrózoamínov a mykotoxínov.

Ak sa testovaná látka aplikuje vo vode alebo v potrave, je nevyhnutné uskutočniť skúšky stability. Na základe skúšok stability a homogenity adekvátne uskutočnených pred štúdiami, pri opakovanej dávke je možné stanoviť, ako často má byť strava pripravovaná a monitorovaná.

Počas sterilizácie krmiva musia byť známe účinky takého pôsobenia na testovanú látku a zložky stravy. V prípade zistenia účinkov musí byť uskutočnená vhodná úprava.

Pri testoch karcinogenity si musia byť experimentátori vedomí možnej prítomnosti kontaminujúcich látok v použitej vode. V zásade vyhovuje pitná voda, pričom by malo byť známe jej zloženie.

Koncentrácia testovanej látky vo výžive sa upravuje podľa rastu zvierat, aby sa udržiaval približne konštantný príjem testovanej látky na jednotku telesnej hmotnosti.

Kontrolná a testovaná strava by mali mať, pokiaľ možno, podobnú nutričnú hodnotu. Je teda potrebné brať do úvahy nutričnú hodnotu testovanej látky zamiešanej do krmiva. Podľa skúseností by menej ako 5 % testovanej látky, ktorá nemá výživové vlastnosti, nemalo mať významnejší vplyv na nutričnú hodnotu výživy.

1. **Inhalačné štúdie**

Nie je stanovený limitný test, nakoľko nebolo možné definovať jedinú limitnú hodnotu inhalačnej expozície.

2. **Štúdie teratogenity**

Testovacie metódy sú primárne zamerané na orálne podávanie. V závislosti od fyzikálnych vlastností testovanej látky alebo od pravdepodobného spôsobu vystavenia človeka je možné použiť iné spôsoby podávania. V takýchto prípadoch sa skúšobný postup zodpovedajúcim spôsobom upraví, pričom sa zohľadnia príslušné kritériá 28 - dňových testov.

3. **Toxiko-kinetika**

Toxiko-kinetické štúdie napomáhajú pri interpretácii a vyhodnotení údajov o toxicite. Tieto štúdie sú určené k objasneniu určitých aspektov toxicity testovanej chemickej látky a výsledky môžu pomôcť pri plánovaní ďalších štúdií toxicity. Nepredpokladá sa, že by bolo vo všetkých prípadoch nevyhnutné stanoviť všetky parametre. Iba v zriedkavých prípadoch bude nevyhnutné uskutočniť kompletnú sadu toxikokinetických štúdií (štúdií absorpcie, vylučovania, distribúcie a metabolizmu). Pre určité zlúčeniny môžu byť vhodné zmeny v tejto sade alebo môže stačiť štúdia s jedinou dávkou.

*Definícia*

| | |
|---|---|
| Toxikokinetika: | štúdie absorpcie, distribúcie, metabolizmu a vylučovania testovaných látok; |
| Absorpcia: | proces, ktorým podaná látka vstupuje do tela; |
| Vylučovanie: | proces, ktorým sú podaná látka a/alebo jej metabolity vylúčené z tela; |
| Distribúcia: | proces, ktorým je absorbovaná látka a/alebo jej metabolity rozdelené v tele; |
| Metabolizmus: | proces, ktorým je podaná látka v tele štruktúrne menená enzymatickými alebo neenzymatickými reakciami. |

4. **Akútne a subakútne štúdie na inom zvieracom druhu**

Účelom štúdie na inom zvieracom druhu je doplniť závery vyplývajúce z prvého testu.

V prípade štúdie na inom zvieracom druhu môžu byť použité už opísané metódy alebo môžu byť upravené pre menší počet zvierat.

5. **Štúdie plodnosti**

Ak je nevyhnutný trojgeneračný test reprodukcie (plodnosti), môže byť už opísaná metóda dvojgeneračného testu reprodukcie rozšírená tak, aby pokrývala tretiu generáciu.

6. **Štúdie mutagenity**

Doplňujúce testy mutagenity, včítane skríningových skúšok karcinogenity

V prílohe VIII smernice sa uvádzajú doplňujúce testy na vyšetrenie mutagenity alebo na skríning karcinogenity. Štúdie uvedené v tejto sekcii môžu byť v zásade použité na obidva účely.

*Úvod*

Prvé posúdenie mutagénnej aktivity látky zahŕňa test na génové (bodové) mutácie u baktérií a testy na cytogenetické poškodenie cicavčích buniek (v podmienkach *in vitro* alebo *in vivo*); vhodné metódy pre túto základnú sadu boli opísané skôr. Táto sekcia sa zaoberá doplňujúcimi testami, ktoré sú vhodné na overenie a/alebo rozšírenie výsledkov základnej sady a slúžia na ďalšie účely:

1. na potvrdenie výsledkov získaných v základnej sade štúdií;

2. na vyšetrenie ukazovateľov, ktoré neboli zahrnuté do základnej sady;

3. na začiatok alebo prehĺbenie štúdií v podmienkach *in vivo*;

Na tieto účely zahŕňajú opísané testy eukaryotické systémy v podmienkach *in vivo* a *in vitro* a rozšírený rad biologických ukazovateľov. Testy poskytujú informácie o bodových mutáciách u organizmov, ktoré sú zložitejšie ako baktérie použité v základnej sade a rozširujú informácie o schopnosti látky indukovať chromozómové aberácie.

Rovnako sú opísané testy iných ukazovateľov, ako sú bodové mutácie a chromozómové aberácie. Poskytujú doplňujúce informácie a môžu byť podľa potreby začlenené do testovacích schém.

Všeobecne platí, že ak sa zvažuje program ďalších štúdií mutagenity, mal by byť navrhnutý takým spôsobom, aby poskytol príslušné doplňujúce informácie o mutagénnom a/alebo karcinogénnom potenciáli látky.

Výber štúdií, ktoré môžu byť vhodné pre daný prípad, závisí od mnohých faktorov, včítane chemických a fyzikálnych vlastností látky, výsledkov základných bakteriálnych a cytogenetických testov, metabolického profilu látky, výsledkov ďalších štúdií toxicity a známych spôsobov použití látky. Pevná schéma výberu testov teda nie je vhodná, s ohľadom na veľký počet faktorov vyžadujúcich zváženie. Určité všeobecné zásady však môžu slúžiť ako návod. Ak by test v základnej sade bol pozitívny, mal by byť medzi doplnkové štúdie zahrnutý aspoň jeden test umožňujúci hodnotiť ten istý genetický ukazovateľ. Pokiaľ boli obidva testy v základne sade negatívne, mali by byť ako doplnkové testy zvyčajne uskutočnené testy génových mutácií a chromozómových aberácií. Rovnako môže byť vhodné získať doplňujúce údaje z indikátorových testov (ako je uvedené nižšie).

Metódy pre tieto vyšetrenia sú nižšie zoskupené na základe ich hlavného (analyzovaného) genetického ukazovateľa.

*Štúdie sledujúce génové (bodové) mutácie*

Na ďalšie vyšetrenie schopnosti látky vyvolávať génové (bodové) mutácie je možné použiť jeden z nasledovných testov:

a) štúdie priamej alebo spätnej mutácie u eukaryotických mikroorganizmov (*Saccharomyces cerevisiae*);

b) štúdie priamych mutácií v cicavčích bunkách v podmienkach *in vitro*;

c) test recesívnej letálnej mutácie viazanej na pohlavie u *Drosophila melanogaster*;

d) test somatických mutácií buniek v podmienkach *in vivo*: spot test na myšiach.

*Štúdie sledujúce chromozómové aberácie*

Na ďalšie vyšetrenie schopnosti látky vyvolávať chromozómové aberácie je možné použiť jeden z nasledovných testov:

a) cytogenetické štúdie cicavcov v podmienkach *in vivo*;

Do úvahy by mala byť braná analýza metafázy buniek kostnej drene, pokiaľ nebola zaradená do základného vyšetrenia (štúdie základnej sady). Okrem toho môže byť tiež uskutočnená cytogenetická analýza zárodočných buniek v podmienkach *in vivo*;

b) cytogenetická štúdia cicavčích buniek v podmienkach *in vitro*, pokiaľ nebola zaradená do základného vyšetrenia;

c) test dominantnej letality na hlodavcoch;

d) test dedičnej translokácie u myší.

*Indikátorové testy účinkov na DNA*

Používajú sa, ak sú k dispozícii metódy, ktoré poskytujú dôkaz niektorých účinkov na DNA, no ich analyzovaným ukazovateľom nie sú ukazovatele mutagénnych účinkov. Tieto štúdie môžu podať doplňujúce informácie k výsledkom štúdií mutagenity a môžu byť užitočné pri interpretácii takýchto štúdií. V prípade potreby môžu byť pre pozorovanie týchto javov vhodné nasledovné metódy využívajúce eukaryotické mikroorganizmy alebo bunky cicavcov:

a) mitotická rekombinácia u *Saccharomyces cerevisiae*;

b) poškodenie a reparácie DNA – neplánovaná syntéza DNA v cicavčích bunkách v podmienkach *in vitro*;

c) výmena sesterských chromatíd v cicavčích bunkách v podmienkach *in vitro*.

*Iné indikátorové metódy vyšetrovania karcinogénneho potenciálu*

Testy transformácie cicavčích buniek umožňujú merať schopnosť látky vyvolať zmeny morfológie a správania v bunkových kultúrach, u ktorých sa predpokladá, že majú súvis s malígnou transformáciou v podmienkach *in vivo*. Použité môžu byť rôzne typy buniek a rôzne kritériá transformácie.

*Posúdenie rizika dedičných účinkov u cicavcov*

Existuje niekoľko metód merania dedičných účinkov vyvolaných genetickými (bodovými) mutáciami u cicavcov (napr. test na špecifické umiestnenie génov v chromozóme u myší ([1])) alebo chromozómových aberácií (napr. test na prenosné translokácie u myší). Tieto metódy je možné použiť na odhad možného genetického rizika, ktoré látka predstavuje pre človeka. Vzhľadom k zložitosti týchto testov a k vysokému nevyhnutnému počtu zvierat, najmä pre test špecifického umiestnenia génov v chromozóme, je však nutné presvedčivé zdôvodnenie pred samotným prevedením týchto štúdií.

([1]) Test špecifického umiestnenia génov v chromozóme u myší (nie je zaradený do tohto dokumentu) môže byť použitý pre meranie mutácie zárodočných buniek v prvej generácii po expozícii mutagénnej látke. Test umožňuje detekovať a kvantifikovať genetické zmeny, ktoré vedú k zmenám v génovom produkte a prejavujú sa viditeľným fenotypom.

TEST SUBCHRONICKEJ ORÁLNEJ TOXICITY

(PO 90 - DŇOVOM OPAKOVANOM ORÁLNOM VYSTAVENÍ U HLODAVCOV)

## 1. METÓDA

### 1.1. Úvod

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.2. Definícia

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.3. Referenčné látky

Žiadne.

### 1.4. Podstata skúšobnej metódy

Testovaná látka sa podáva denne, orálne, v odstupňovaných dávkach niekoľkým skupinám pokusných zvierat, každej skupine jedna úroveň dávky 90 dní. V priebehu obdobia podávania sa zvieratá každý deň pozorujú, aby sa zistili príznaky toxicity. Zvieratá, ktoré počas skúšky uhynuli a i zvieratá, ktoré do konca skúšky prežili, sa pitvú.

### 1.5. Kritériá kvality

Neustanovené.

### 1.6. Opis testovacej metódy

*Príprava*

Najmenej päť dní pred testom si zvieratá zvykajú na chovateľské a vyživovacie podmienky, v ktorých budú počas experimentu. Pred testom sa zdravé mladé zvieratá randomizujú a priradia sa k pokusným a kontrolným skupinám.

Testovanú látku je možné dávkovať v potrave ako sondu, v kapsliach alebo v pitnej vode. Môžu sa použiť aj iné prostriedky dávkovania. Všetkým zvieratám sa testovaná látka dávkuje počas celého obdobia testu rovnakou metódou. Ak sa na uľahčenie dávkovania použije pomocná látka alebo iná prísada, musí byť zabezpečený jej účinok, ktorý nie je toxický. Na to sa podľa možností môžu použiť údaje z predchádzajúcich testov.

*Podmienky testovania*

Pokusné zvieratá

Ak neexistujú mimoriadne dôvody, uprednostňuje sa potkan. Používajú sa mladé zdravé zvieratá známych pokusných kmeňov, v ideálnom prípade by na počiatku dávkovania látky mali byť potkany mladšie ako 6 týždňov, v žiadnom prípade by nemali byť staršie ako 8 týždňov. Na začiatku testu by nemali odchýlky hmotnosti použitých zvierat byť viac ako ± 20 % od prispôsobenej strednej priemernej hodnoty. Ak sa uprednostňuje subchronická orálna štúdia ako predbežná štúdia pred dlhodobou štúdiou, mal by byť v oboch štúdiách použitý rovnaký druh zvierat a rovnaký kmeň.

Počet a pohlavie

Pre každú pokusnú skupinu by sa malo použiť minimálne 20 zvierat (10 samičiek a 10 samčekov). Samičky nesmú byť ani po vrhu a ani nesmú byť gravidné. Ak majú byť počas testu usmrtené zvieratá, zvýši sa celkový počet zvierat o počet zvierat, ktoré majú byť usmrtené ešte pred koncom testu. Okrem toho sa môže vystaviť aj dodatočná skupina (satelitná skupina) s 20 zvieratami (10 samičiek a 10 samčekov) počas 90 dní s najvyššou dávkou, aby sa počas 28 dní po vystavení mohla sledovať reverzibilita, pretrvávanie alebo oneskorený prejav toxických účinkov.

Expozičné koncentrácie

Potrebné sú minimálne tri koncentrácie a jedna kontrolná skupina. Odhliadnuc od aplikácie testovanej látky musia sa zvieratá v kontrolnej skupine vystaviť rovnako ako pokusné zvieratá. Ak sa pre uľahčenie dávkovania používa pomocná látka, podáva sa kontrolnej skupine rovnakým spôsobom ako pokusným zvieratám, a to v rovnakom množstve, aké prijme skupina, ktorej sa aplikuje najvyššia dávka. Najvyššia koncentrácia sa volí tak, aby v každom prípade došlo k toxickému účinku, ale aby zvieratá nehynuli alebo iba v malom množstve. Najnižšia koncentrácia nesmie spôsobovať žiadne príznaky toxicity. Ak existujú použiteľné odhady o výške vystavenia u človeka, najnižšia dávka musí túto hodnotu prekročiť. V ideálnom prípade by mala stredná dávka spôsobiť len nízke toxické účinky. Ak sa podávajú viaceré medzikoncentrácie, tak sa musia voliť tak, aby došlo k postupnej klasifikácii toxických účinkov.

V skupinách s nízkou a strednou koncentráciou, ako aj v kontrolných skupinách, by mal byť počet úmrtí nízky, aby sa umožnilo výrazne vyhodnotenie výsledkov.

Ak sa testovaná látka aplikuje v potrave, môže sa použiť buď konštantná koncentrácia v potrave (v jednotkách ppm alebo mg/kg potravy), alebo konštantné dávkovanie aproximované na telesnú hmotnosť zvieraťa; použitá alternatívna možnosť musí byť špecifikovaná. Ak sa testovaná látka podáva sondou, malo by sa tak robiť každý deň približne v rovnaký čas. Dávkovanie by sa malo podľa potreby v pravidelných intervaloch (týždenných alebo dvojtýždenných) prispôsobovať tak, aby bolo konštantné vzhľadom na telesnú hmotnosť zvieraťa.

Limitný test

Pokiaľ 90 - dňová skúška uskutočnená nižšie opísanou metódou nevyvolá žiadne toxické účinky pri koncentrácii 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti za deň alebo pri vyššej koncentrácii zodpovedajúcej prispôsobenému vystaveniu u človeka, ak je táto známa, nie je ďalšie testovanie nutné. Ak sa podáva látka o nízkej toxicite v potrave, je nutné zaistiť, aby ani aplikované množstvo, ani ďalšie vlastnosti testovanej látky neboli prekážkou normálnej výživy zvierat.

Doba pozorovania

Všetky zvieratá sa pozorujú denne a zaznamenávajú sa prejavy toxicity, včítane času nástupu, závažnosti a trvania. Zaznamenajú sa: doba úmrtia a čas, v ktorom sa objavili a znova odzneli toxické účinky.

*Postup*

Testovaná látka sa v ideálnom prípade zvieratám podáva sedem dní v týždni po dobu 90 dní. Zvieratá satelitnej skupiny, ktoré sú určené na dodatočné pozorovanie, by mali byť ďalších 28 dní bez vystavenia, aby sa dala zistiť reverzibilita toxických účinkov alebo ich pretrvávanie.

Pozorovanie v klietke zahŕňa zmeny kože, srsti, očí, slizníc, dýchacieho systému a krvného obehu, zmeny funkcie autonómnej a centrálnej nervovej sústavy, somatomotoriky a správania. Meranie spotreby potravy (a spotreby vody pri aplikácii testovanej látky v pitnej vode) a hmotnosti zvierat sa uskutočňujú týždenne.

Je nutné zaistiť pravidelnú kontrolu zvierat, aby pokiaľ možno počas testu nedochádzalo k stratám zvierat, napr. v dôsledku kanibalizmu, autolýzy tkanív alebo chybou pri premiestňovaní zvierat. Po ukončení fázy vystavenia sa všetky zvieratá, ktoré prežili, s výnimkou zvierat satelitnej skupiny, pitvú. Zvieratá, ktoré sú pred smrťou, by sa mali vytriediť, humánne usmrtiť a pitvať.

U všetkých zvierat, včítane kontrolných, sa zvyčajne vykonávajú nasledovné vyšetrenia:

a) Oftalmologické vyšetrenie pomocou oftalmoskopu alebo rovnakého vhodného prístroja by sa malo vykonať pred expozíciou voči testovanej látke a na konci štúdie, najlepšie u všetkých zvierat, aspoň však v skupine s najvyššou dávkou a v kontrolnej skupine. Ak sa na konci testu zistia zmeny na očiach, vyšetria sa všetky zvieratá.

b) Na konci testu by sa malo vykonať hematologické vyšetrenie, ktoré má zahŕňať hodnotu hematokrytu, koncentráciu hemoglobínu, počet erytrocytov, leukocytov, diferenciálny obraz, hemokoagulačné parametre ako testy zrážania krvi, zmeria sa napríklad čas zrážania, protrombínový čas, tromboplastínový čas alebo počet trombocytov.

c) Na konci testu by sa mali vykonať biochemické analýzy krvi. Pre tieto štúdie je vhodné analyzovať koncentráciu elektrolytov, metabolizmus glycidov, funkciu pečene a ľadvín. Výber špecifických skúšok bude odvodený z pozorovania spôsobu účinku látky. Navrhované vyšetrenia zahŕňajú stanovenie vápniku,

fosforu, chloridov, sodíku, draslíku, glukózy na lačno (s pôstnou periodou určenou pre druh zvieraťa), hladiny sérovej glutamátpyruvát transaminázy ([1]), glutamátoxalacetát transaminázy ([2]), ornitindekarboxylázy, gamaglutamyltranspeptidázy, dusíku močoviny, albumínu, kreatinínu, celkového bilirubínu a celkových sérových bielkovín. Medzi ďalšie stanovenia, ktoré môžu byť nevyhnutné pre správne toxikologické hodnotenie, patrí stanovenie lipidov, hormónov, rovnováhy kyselín a zásad, methemoglobínu a aktivity cholinesterázy. Dodatočné biochemické analýzy môžu byť použité, ak je nevyhnutné prehĺbenie vyšetrenia pozorovaných toxických účinkov.

d) Analýza moču nie je spravidla potrebná, potrebná je vtedy, ak sa pozoruje alebo očakáva toxický účinok.

Ak údaje z predošlých testov neboli preukázané, mal by sa brať ohľad na hematologické a biochemické parametre pred začiatkom testu.

Autopsia

U všetkých zvierat zúčastňujúcich sa na teste sa musí vykonať kompletná autopsia skladajúca sa z vonkajšej prehliadky povrchu tela, všetkých telesných otvorov, lebečnej, hrudnej a brušnej dutiny, včítane ich obsahu. Pečeň, obličky, nadobličky a semenníky sa musia čo najskôr po sekcii odvážiť vlhké, aby sa predišlo vysušeniu.

Nasledovné orgány a tkanivá je nutné uchovať vo vhodnom médiu pre prípadné neskoršie histopatologické vyšetrenia: všetky orgány s makroskopickými zmenami, mozog – vrátane medulla/pons, kôry malého a veľkého mozgu, hypofýza, štítna žľaza/prištítna žľaza, všetky týmusové tkanivá, priedušnice a pľúca, srdce, aorta, (slinné žľazy), pečeň, slezina, obličky, nadobličky, pankreas, gonády, maternica (akcesórne pohlavné orgány), (kôža), ezofagus, žalúdok, dvanástnik, jejunum, ileum, caecum, kolon, rektum, močový mechúr, reprezentatívne lymfatické uzliny, (samičie prsné žľazy), (svalstvo stehna), nervy periférneho systému, hrudná kosť s kostnou dreňou, (oči), (femur, včítane povrchu kĺbu), (miecha v troch úrovniach – oblasť krku, toraxu a bedier) a (extraorbitálna slzná žľaza). Tkanivá uvedené v zátvorkách sa vyšetrujú iba v prípade, ak je možné na ich postihnutie usudzovať na základe príznakov toxicity alebo pokiaľ súvisia s cieľovým orgánom.

Histopatologické vyšetrenie

a) Kompletné histopatologické vyšetrenie orgánov a tkanív sa uskutoční u všetkých zvierat skupiny, ktorým bola aplikovaná najvyššia dávka a u zvierat kontrolnej skupiny.

b) Vyšetria sa všetky orgány s makroskopickými zmenami.

c) Vyšetria sa cieľové orgány zvierat ostatných dávkových skupín.

d) Pľúca zvierat v skupinách s nízkou a strednou koncentráciou sa histopatologicky vyšetria k zisteniu príznakov infekcie, aby to umožnilo vhodné posúdenie zdravotného stavu zvierat. Uváži sa vhodnosť histopatologického vyšetrenia pečene a obličiek u týchto skupín. Ďalšie histopatologické vyšetrenie sa u zvierat týchto skupín nemusí uskutočňovať rutinne, musí sa však uskutočniť vždy na orgánoch, na ktorých boli zistené zmeny v skupine s najvyššou koncentráciou.

e) U zvierat satelitnej skupiny sa musia histopatologicky vyšetriť tie tkanivá a orgány, ktoré v exponovaných skupinách reagujú na testovanú látku.

## 2. ÚDAJE

Údaje sa zhrnú do tabuľky, pričom sa uvedie u každej pokusnej skupiny počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat so zmenami, druh zmien ako aj percento zvierat pre každý druh zmeny. Výsledky sa vyhodnotia vhodným štatistickým postupom. Môže byť použitá akákoľvek uznávaná štatistická metóda.

## 3. SPRÁVA

### 3.1. Správa z testu

Správa z testu musí, pokiaľ možno, obsahovať tieto informácie:

— živočíšny druh, kmeň, pôvod, chovateľské podmienky, krmivo,

— podmienky testu,

— koncentrácie vystavenia (včítane pomocnej látky, ak je použitá),

— údaje o toxických reakciách podľa pohlavia a dávky,

([1]) V súčasnosti známa ako sérová alanín aminotransferáza.
([2]) V súčasnosti známa ako sérová aspartát aminotransferáza.

— koncentrácie bez účinku, pokiaľ ich možno stanoviť,
— čas úmrtia počas experimentu, prípadne údaj o prežití zvierat do konca testu,
— opis toxických alebo iných účinkov,
— čas, keď boli pozorované jednotlivé abnormálne príznaky a ich ďalší vývoj,
— údaje o spotrebe potravy a o telesnej hmotnosti,
— oftalmologické nálezy,
— uskutočnené hematologické vyšetrenia a ich výsledky,
— uskutočnené biochemické vyšetrenia a ich výsledky (včítane výsledkov prípadných analýz moču),
— sekčné nálezy,
— podrobný opis všetkých histopatologických nálezov,
— štatistické vyhodnotenie výsledkov, kde je to možné,
— diskusia k výsledkom,
— vyhodnotenie výsledkov.

3.2. **Vyhodnotenie a interpretácia**

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

TEST SUBCHRONICKEJ ORÁLNEJ TOXICITY

PO 90 - DŇOVOM OPAKOVANOM ORÁLNOM VYSTAVENÍ U NEHLODAVCOV

## 1. METÓDA

### 1.1. Úvod

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.2. Definícia

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.3. Referenčné látky

Žiadne.

### 1.4. Podstata skúšobnej metódy

Testovaná látka sa podáva denne, orálne, v odstupňovaných dávkach niekoľkým skupinám pokusných zvierat, každej skupine jedna úroveň dávky 90 dní. V priebehu období podávania sa zvieratá každý deň pozorujú, aby sa zistili príznaky toxicity. Zvieratá, ktoré počas skúšky uhynuli a i zvieratá, ktoré do konca skúšky prežili, sa pitvú.

### 1.5. Kritériá kvality

Neustanovené.

### 1.6. Opis testovacej metódy

*Príprava*

Najmenej päť dní pred testom si zvieratá zvykajú na chovateľské a vyživovacie podmienky, v ktorých budú počas experimentu. Pred testom sa zdravé mladé zvieratá randomizujú a priradia sa k pokusným a kontrolným skupinám.

Testovanú látku je možné dávkovať v potrave alebo v kapsliach, ak sa to javí byť vhodnejšie. Môžu sa použiť aj iné prostriedky dávkovania. Všetkým zvieratám sa testovaná látka dávkuje počas celého obdobia testu rovnakou metódou. Ak sa na uľahčenie dávkovania použije pomocná látka alebo iná prísada, musí byť zabezpečený jej účinok, ktorý nie je toxický. Na to sa podľa možností môžu použiť údaje z predchádzajúcich testov.

*Podmienky testovania*

Pokusné zvieratá

Ak neexistujú kontraindikácie, uprednostňuje sa ako druh – nehlodavec - pes, pričom sa dáva prednosť definovanému plemenu. Môžu sa použiť aj iné druhy nehlodavcov. Používajú sa mladé zdravé zvieratá; v prípade psov sa s dávkovaním začína vo veku od štyroch do šiestich mesiacov a v žiadnom prípade by nemali byť psi starší ako deväť mesiacov. Ak sa uprednostňuje subchronická orálna štúdia ako predbežná štúdia pred dlhodobou štúdiou, mal by byť v oboch štúdiách použitý rovnaký druh zvierat a rovnaké plemeno.

Počet a pohlavie

Pre každú koncentráciu sa použije najmenej osem zvierat (štyri samičky a štyria samčekovia). Počet zvierat na konci pokusu musí byť taký, aby umožnil vyhodnotenie toxických účinkov.

Expozičné koncentrácie

Potrebné sú minimálne tri koncentrácie a jedna kontrolná skupina. Odhliadnuc od aplikácie testovanej látky musia sa zvieratá v kontrolnej skupine vystaviť rovnako ako pokusné zvieratá. Najvyššia koncentrácia sa volí tak, aby v každom prípade došlo k toxickému účinku, ale aby zvieratá nehynuli alebo iba v malom množstve. Najnižšia koncentrácia nesmie spôsobovať žiadne príznaky toxicity.

Ak existujú použiteľné odhady o výške expozície u človeka, najnižšia dávka musí túto hodnotu prekročiť. V ideálnom prípade by mala stredná dávka spôsobiť len nízke toxické účinky. Ak sa podávajú viaceré medzikoncentrácie, musia sa voliť tak, aby došlo k postupnej klasifikácii toxických účinkov.

V skupinách s nízkou a strednou koncentráciou ako aj v kontrolných skupinách by sa tiež nemali vyskytovať úmrtia.

V skupinách s nízkou toxicitou je dôležité sa uistiť, že ak sa testovaná látka aplikuje v potrave, množstvo testovanej látky nesmie interferovať s bežnými vyživovateľskými podmienkami.

Ak sa testovaná látka aplikuje v potrave, môže sa použiť buď konštantná koncentrácia v potrave (v jednotkách ppm alebo mg/kg potravy), alebo konštantné dávkovanie aproximované na telesnú hmotnosť zvieraťa; použitá alternatívna možnosť musí byť špecifikovaná. Ak sa testovaná látka podáva priamo, napr. v kapsliach, malo by sa tak robiť každý deň približne v rovnaký čas. Dávkovanie by sa malo podľa potreby v pravidelných týždenných intervaloch prispôsobovať tak, aby bolo konštantné vzhľadom na telesnú hmotnosť zvieraťa. Ak sa vykoná subchronický test ako predbežná štúdia pred dlhodobým testom, použijú sa rovnaké vyživovacie podmienky v oboch testoch.

Limitný test

Pokiaľ 90 - dňová skúška uskutočnená opísanou metódou nevyvolá žiadne toxické účinky pri koncentrácii 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti za deň alebo pri vyššej koncentrácii zodpovedajúcej prispôsobenému vystaveniu u človeka, ak je táto známa, nie je ďalšie testovanie nutné. Ak sa podáva látka o nízkej toxicite v potrave, je nutné zaistiť, aby ani aplikované množstvo, ani ďalšie vlastnosti testovanej látky neboli prekážkou normálnej výživy zvierat.

Doba pozorovania

Všetky zvieratá sa pozorujú denne a zaznamenávajú sa prejavy toxicity, včítane času nástupu, závažnosti a trvania. Zaznamenajú sa: doba úmrtia a čas, v ktorom sa objavili a znova odzneli toxické účinky.

*Postup*

Testovaná látka sa v ideálnom prípade zvieratám podáva sedem dní v týždni počas 90 dní. Ak sa však testovaná látka aplikuje iným spôsobom ako v potrave, považuje sa z praktických dôvodov za prijateľné podávať látku 5 dní v týždni.

Pozorovanie zahŕňa zmeny kože, srsti, očí, slizníc, dýchacieho systému a krvného obehu, zmeny funkcie autonómnej a centrálnej nervovej sústavy, somatomotoriky a správania. Meranie spotreby potravy (a spotreby vody pri aplikácii testovanej látky v pitnej vode) a hmotnosti zvierat sa uskutočňujú týždenne.

Denne sa vykonávajú opatrné klinické vyšetrenia zvierat tak, aby prijaté vhodné opatrenia minimalizovali straty zvierat zahrnutých v teste. Po ukončení fázy vystavenia sa všetky zvieratá, ktoré prežili, s výnimkou zvierat satelitnej skupiny, pitvú. Zvieratá, ktoré sú pred smrťou, by sa mali vytriediť, humánne usmrtiť a pitvať.

U všetkých zvierat, včítane kontrolných, sa zvyčajne vykonávajú nasledujúce vyšetrenia:

a) Oftalmologické vyšetrenie pomocou oftalmoskopu alebo rovnakého vhodného prístroja by sa malo vykonať pred expozíciou voči testovanej látke a na konci štúdie, najlepšie u všetkých zvierat, aspoň však v skupine s najvyššou dávkou a v kontrolnej skupine. Ak sa na konci testu zistia zmeny na očiach, vyšetria sa všetky zvieratá.

b) Na konci testu by sa malo vykonať vykonať hematologické vyšetrenie, ktoré má zahŕňať hodnotu hematokrytu, koncentráciu hemoglobínu, počet erytrocytov, leukocytov, diferenciálny obraz, hemokoagulačné parametre ako testy zrážania krvi, zmeria sa napríklad čas zrážania, protrombínový čas, tromboplastínový čas alebo počet trombocytov.

c) Na konci testu by sa mali vykonať biochemické analýzy krvi. Pre tieto štúdie je vhodné analyzovať koncentráciu elektrolytov, metabolizmus glycidov, funkciu pečene a ľadvín. Výber špecifických skúšok bude odvodený z pozorovania spôsobu účinku látky. Navrhované vyšetrenia zahŕňajú stanovenie vápniku, fosforu, chloridov, sodíku, draslíku, glukózy na lačno (s pôstnou periodou určenou pre druh zvietraťa), hladiny sérovej glutamátpyruvát transaminázy ([1]), glutamátoxalacetát transaminázy ([2]), ornitindekarboxylázy,

([1]) V súčasnosti známa ako sérová alanín aminotransferáza.
([2]) V súčasnosti známa ako sérová aspartát aminotransferáza.

gamaglutamyltranspeptidázy, dusíku močoviny, albumínu, kreatinínu, celkového bilirubínu a celkových sérových bielkovín. Medzi ďalšie stanovenia, ktoré môžu byť nevyhnutné pre správne toxikologické hodnotenie, patrí stanovenie lipidov, hormónov, rovnováhy kyselín a zásad, methemoglobínu a aktivity cholinesterázy. Dodatočné biochemické analýzy môžu byť použité, ak je nevyhnutné prehĺbenie vyšetrenia pozorovaných toxických účinkov.

d) Analýza moču nie je spravidla potrebná, potrebná je vtedy, ak sa pozoruje alebo očakáva toxický účinok.

Autopsia

U všetkých zvierat zúčastňujúcich sa na teste sa musí vykonať kompletná autopsia skladajúca sa z vonkajšej prehliadky povrchu tela, všetkých telesných otvorov, lebečnej, hrudnej a brušnej dutiny, včítane ich obsahu. Pečeň, obličky, nadobličky, tyroid (ako aj paratyroid) a semenníky sa musia čo najskôr po sekcii odvážiť vlhké, aby sa predišlo vysušeniu.

Nasledovné orgány a tkanivá je nutné uchovať vo vhodnom médiu pre prípadné neskoršie histopatologické vyšetrenia: všetky orgány s makroskopickými zmenami, mozog – vrátane medulla/pons, kôry malého a veľkého mozgu, hypofýza, štítna žľaza/príštitna žľaza, všetky týmusové tkanivá, priedušnice a pľúca, srdce, aorta, (slinné žľazy), pečeň, slezina, obličky, nadobličky, pankreas, gonády, maternica (akcesórne pohlavné orgány), (kôža), ezofagus, žalúdok, dvanástnik, jejunum, ileum, coecum, kolon, rektum, močový mechúr, reprezentatívne lymfatické uzliny, (samičie prsné žľazy), (svalstvo stehna), nervy periférneho systému, hrudná kosť s kostnou dreňou, (oči), (femur, včítane povrchu kĺbu), (miecha v troch úrovniach – oblasť krku, toraxu a bedier) a (extraorbitálna slzná žľaza). Tkanivá uvedené v zátvorkách sa vyšetrujú iba v prípade, že je možné ich postihnutie usudzovať na základe príznakov toxicity alebo pokiaľ súvisia s cieľovým orgánom.

Histopatologické vyšetrenie

Kompletné histopatologické vyšetrenie orgánov a tkanív by sa malo uskutočniť u všetkých zvierat skupiny, ktorým bola aplikovaná najvyššia dávka a u zvierat kontrolnej skupiny. Doplňujúce histopatologické vyšetrenia v skupinách s inými koncentráciami by sa malo vyšetriť v prípade orgánov, ktoré vykazujú zmeny v skupine s najvyššou koncentráciou alebo ak si to vyžadujú indikácie z klinických štúdií.

## 2. ÚDAJE

Údaje by sa mali zhrnúť do tabuľky, pričom sa uvedie u každej pokusnej skupiny počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat so zmenami, druh zmien ako aj percento zvierat pre každý druh zmeny. Výsledky sa vyhodnotia vhodným štatistickým postupom. Môže byť použitá akákoľvek uznávaná štatistická metóda.

## 3. SPRÁVA

### 3.1. Správa z testu

Správa z testu obsahuje, pokiaľ možno, tieto informácie:

— živočíšny druh, kmeň, pôvod, chovateľské podmienky, krmivo,

— podmienky testu,

— expozičné koncentrácie (včítane pomocnej látky, ak je použitá),

— údaje o toxických reakciách podľa pohlavia a dávky,

— koncentrácie bez účinku, pokiaľ ju možno stanoviť,

— čas úmrtia počas experimentu, prípadne údaj o prežití zvierat do konca testu,

— opis toxických alebo iných účinkov,

— čas, keď boli pozorované jednotlivé abnormálne príznaky a ich ďalší vývoj,

— údaje o spotrebe potravy a o telesnej hmotnosti,

— oftalmologické nálezy,

— uskutočnené hematologické vyšetrenia a ich výsledky,
— uskutočnené biochemické vyšetrenia a ich výsledky (včítane výsledkov prípadných analýz moču),
— sekčné nálezy,
— podrobný opis všetkých histopatologických nálezov,
— štatistické vyhodnotenie výsledkov, kde je to možné,
— diskusia k výsledkom,
— vyhodnotenie výsledkov.

3.2. **Vyhodnotenie a interpretácia**

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

ŠTÚDIA SUBCHRONICKEJ DERMÁLNEJ TOXICITY

PO 90 - DŇOVEJ OPAKOVANEJ KOŽNEJ APLIKÁCII U HLODAVCOV

## 1. METÓDA

### 1.1. Úvod

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.2. Definícia

Pozri všobecný úvod časť B.

### 1.3. Referenčné látky

Žiadne.

### 1.4. Podstata skúšobnej metódy

Testovaná látka sa denne nanáša na kožu, v odstupňovaných dávkach niekoľkým skupinám pokusných zvierat, každej skupine jedna úroveň dávky 90 dní. V priebehu obdobia podávania sa zvieratá každý deň pozorujú, aby sa zistili príznaky toxicity. Zvieratá, ktoré počas skúšky uhynuli a i zvieratá, ktoré do konca skúšky prežili, sa pitvú.

### 1.5. Kritériá kvality

Neustanovené.

### 1.6. Opis testovacej metódy

*Príprava*

Najmenej päť dní pred testom si zvieratá zvykajú na chovateľské a vyživovacie podmienky, v ktorých budú počas experimentu. Pred testom sa zdravé mladé zvieratá randomizujú a priradia sa k pokusným a kontrolným skupinám. Krátko pred začatím testu sa zvieratám ostrihá srsť na chrbte. Vyholenie srsti je tiež prípustné, malo by sa však uskutočniť asi 24 hodín pred testom. Ostrihanie alebo oholenie je zvyčajne potrebné opakovať približne v týždenných intervaloch. Pri strihaní alebo holení srsti je potrebné dať pozor na to, aby sa neporanila koža. Pre aplikáciu testovanej látky sa pripraví najmenej 10 % povrchu tela. Pri rozhodovaní o veľkosti pripravovanej plochy kože, ktorá má byť zbavená srsti a o veľkosti krycieho obväzu je treba vziať do úvahy hmotnosť zvierat. Pri testoch pevných látok, ktoré môžu byť v prípade potreby rozdrvené na prach, sa testovaná látka dostatočne navlhčí vodou, poprípade vhodnou pomocnou látkou, aby bol zaistený dostatočný styk s kožou. Kvapalné testované látky sa spravidla aplikujú neriedené. Aplikácia sa uskutočňuje päť až sedem dní v týždni.

*Podmienky testovania*

Pokusné zvieratá

Je možné použiť potkana, králika alebo morča. Je možné použiť aj iné živočíšne druhy, ale ich použitie musí byť zdôvodnené. Na začiatku testu by nemali byť odchýlky hmotnosti použitých zvierat viac ako ± 20 % od prispôsobenej strednej priemernej hodnoty. Ak sa uprednostňuje subchronická dermálna štúdia ako predbežná štúdia pred dlhodobou štúdiou, mal by byť v oboch štúdiách použitý rovnaký druh zvierat a rovnaký kmeň.

Počet a pohlavie

Pre každú pokusnú skupinu by sa malo použiť minimálne 20 zvierat (10 samičiek a 10 samčekov) so zdravou kožou. Samičky nesmú byť ani po vrhu a ani nesmú byť gravidné. Ak majú byť počas testu usmrtené zvieratá, zvýši sa celkový počet zvierat o počet zvierat, ktoré majú byť usmrtené ešte pred koncom testu. Okrem toho sa môže vystaviť aj dodatočná skupina (satelitná skupina) s 20 zvieratami (10 samičiek a 10 samčekov) počas 90 dní najvyššej dávke, aby sa počas 28 dní po vystavení mohla sledovať reverzibilita, pretrvávanie alebo oneskorený prejav toxických účinkov.

Expozičné koncentrácie

Potrebné sú minimálne tri koncentrácie a jedna kontrolná skupina. Odhliadnuc od aplikácie testovanej látky sa zvieratá v kontrolnej skupine musia vystaviť rovnako ako pokusné zvieratá. Ak sa pre uľahčenie dávkovania používa pomocná látka, podáva sa kontrolnej skupine rovnakým spôsobom ako pokusným zvieratám, a to v rovnakom množstve, aké prijme skupina, ktorej sa aplikuje najvyššia dávka. Doba vystavenia by mala byť najmenej šesť hodín denne. Testovaná látka by sa mala aplikovať každý deň približne v rovnakom čase a dávkovanie by malo byť pravidelne (týždenne alebo každých štrnásť dní) prispôsobené, aby bolo konštantné vzhľadom na telesnú hmotnosť zvieraťa. Najvyššia koncentrácia sa volí tak, aby v každom prípade došlo k toxickému účinku, ale aby zvieratá nehynuli alebo iba v malom množstve. Najnižšia koncentrácia by nemala spôsobovať žiadne príznaky toxicity. Ak existujú použiteľné odhady o úrovni vystavenia u človeka, najnižšia dávka by mala túto hodnotu prekročiť. V ideálnom prípade by mala stredná dávka spôsobiť len nízke toxické účinky. Ak sa podávajú viaceré medzikoncentrácie, musia sa voliť tak, aby došlo k postupnej klasifikácii toxických účinkov. V skupinách s nízkou a strednou koncentráciou, ako aj v kontrolných skupinách, by mal byť počet úmrtí nízky, aby sa umožnilo výrazne vyhodnotenie výsledkov.

Ak aplikácia testovanej látky smeruje k závažnému podráždeniu kože, je potrebné znížiť dávku, čo u vysokej koncentrácie môže viesť k obmedzeniu alebo eliminácii iných toxických účinkov. Ak už došlo k závažnému poškodeniu kože, je potrebné test ukončiť a uskutočniť ho znova s nižšími koncentráciami.

Limitný test

Ak predbežná štúdia pri koncentrácii 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti za deň alebo pri vyššej koncentrácii zodpovedajúcej prispôsobenej vystaveniu u človeka, ak je táto známa, nevyvolá žiadne toxické účinky, nie je ďalšie testovanie nutné.

Doba pozorovania

Zvieratá sa pozorujú denne a zaznamenávajú sa prejavy toxicity, včítane času úmrtia a času, v ktorom sa objavili a znova odzneli toxické účinky.

*Postup*

Zvieratá sa chovajú jednotlivo v klietkach. Testovaná látka sa v ideálnom prípade zvieratám podáva sedem dní v týždni po dobu 90 dní.

Zvieratá satelitnej skupiny, ktoré sú určené na dodatočné pozorovanie, by nemali byť ďalších 28 dní vystavené, aby sa dala zistiť reverzibilita toxických účinkov alebo pretrvávanie toxických účinkov. Doba vystavenia by mala byť najmenej šesť hodín denne.

Testovaná látka sa nanesie rovnomerne na plochu, ktorá sa rovná asi 10 % celkového povrchu tela. V prípade vysokotoxických látok môže byť táto plocha menšia, no mala by sa však pokryť čo najväčší časť tejto plochy čo najslabšou a najrovnomernejšou vrstvou.

Počas vystavenia sa testovaná látka udržuje v styku s kožou pomocou porézneho mulového obväzu a nedráždivej náplasti. Testovaná plocha sa ďalej vhodným spôsobom prekryje, aby sa mulový obväz a testovaná látka fixovali a aby zvieratá testovanú látku nepožili. K zamedzeniu požitia látky je možné použiť aj prostriedky pre obmedzenie voľnosti pohybu, celkové znehybnenie sa však neodporúča.

Po uplynutí doby vystavenia sa odstránia zvyšky testovanej látky, pokiaľ možno vodou alebo iným vhodným spôsobom očistenia kože.

Všetky zvieratá sa pozorujú denne a zaznamenávajú sa prejavy toxicity, včítane času nástupu, závažnosti a trvania. Pozorovanie v klietke zahŕňa zmeny kože, srsti, očí, slizníc, dýchacieho systému a krvného obehu, zmeny funkcie autonómnej a centrálnej nervovej sústavy, somatomotoriky a správania. Meranie spotreby potravy a hmotnosti zvierat sa uskutočňuje týždenne. Je nutné zaistiť pravidelnú kontrolu zvierat, aby pokiaľ možno počas testu nedochádzalo k stratám zvierat, napr. v dôsledku kanibalizmu, autolýzy tkanív alebo chybou pri premiestňovaní zvierat. Po ukončení fázy vystavenia sa všetky zvieratá, ktoré prežili, s výnimkou zvierat satelitnej skupiny, pitvú. Zvieratá, ktoré sú pred smrťou, by sa mali vytriediť, humánne usmrtiť a pitvať.

U všetkých zvierat, včítane kontrolných, sa zvyčajne uskutočňujú nasledujúce vyšetrenia:

a) Oftalmologické vyšetrenie pomocou oftalmoskopom alebo rovnakého vhodného prístroja by sa malo vykonať pred vystavením testovanej látke a na konci štúdie, najlepšie u všetkých zvierat, aspoň však v skupine s najvyššou dávkou a v kontrolnej skupine. Ak sa na konci testu zistia zmeny na očiach, vyšetria sa všetky zvieratá.

b) Na konci testu sa musia vykonať hematologické vyšetrenia, ktoré majú zahŕňať hodnotu hematokrytu, koncentráciu hemoglobínu, počet erytrocytov, leukocytov, diferenciálny obraz, hemokoagulačné parametre ako testy zrážania krvi, zmeria sa napríklad čas zrážania, protrombínový čas, tromboplastínový čas alebo počet trombocytov.

c) Na konci testu by sa mali vykonať biochemické analýzy krvi. Pre tieto štúdie je vhodné analyzovať koncentráciu elektrolytov, metabolizmus glycidov, funkciu pečene a ľadvín. Výber špecifických testov bude odvodený z pozorovania spôsobu účinku látky. Navrhované vyšetrenia zahŕňajú stanovenie vápniku, fosforu, chloridov, sodíku, draslíku, glukózy na lačno (s pôstnou periodou určenou pre druh zvieraťa), hladiny sérovej glutamát-pyruvát transaminázy ([1]), glutamátoxalacetáttransaminázy ([2]), ornitíndekarboxylázy, gamaglutamyltranspeptidázy, dusíku močoviny, albumínu, kreatinínu, celkového bilirubínu a celkových sérových bielkovín.

Medzi ďalšie stanovenia, ktoré môžu byť nevyhnutné pre správne toxikologické hodnotenie, patrí stanovenie lipidov, hormónov, rovnováhy kyselín a zásad, methemoglobínu a aktivity cholinesterázy. Dodatočné biochemické analýzy môžu byť použité, ak je nevyhnutné prehĺbenie vyšetrenia pozorovaných toxických účinkov.

d) Analýza moču nie je spravidla potrebná, potrebná je vtedy, ak sa očakáva alebo pozoruje toxický účinok.

Ak údaje z predošlých testov boli nepreukázané, mal by sa brať ohľad na hematologické a biochemické parametre ešte pred začiatkom testu.

Autopsia

U všetkých zvierat zúčastňujúcich sa na teste sa musí vykonať kompletná autopsia skladajúca sa z vonkajšej prehliadky povrchu tela, všetkých telesných otvorov, lebečnej, hrudnej a brušnej dutiny, včítane ich obsahu. Pečeň, obličky, nadobličky a semenníky sa musia čo najskôr po sekcii odvážiť vlhké, aby sa predišlo vysušeniu. Nasledovné orgány a tkanivá je nutné uchovať vo vhodnom médiu pre prípadné neskoršie histopatologické vyšetrenia: všetky orgány s makroskopickými zmenami, mozog – vrátane medula/pons, kôry malého a veľkého mozgu, hypofýza, štítna žľaza/príštitna žľaza, všetky týmusové tkanivá, (priedušnice), pľúca, srdce, aorta, slinné žľazy, pečeň, slezina, obličky, nadobličky, pankreas, gonády, maternica, akcesórne pohlavné orgány, žlčník (ak je prítomný), ezofagus, žalúdok, dvanástnik, jejunum, ileum, caecum, kolon, rektum, močový mechúr, reprezentatívne lymfatické uzliny, (samičie prsné žľazy), (svalstvo stehna), nervy periférneho systému, (oči), (hrudná kosť s kostnou dreňou), (femur včítane povrchu kĺbu), (miecha v troch úrovniach – oblasť krku, toraxu a bedier) a (extraorbitálna slzná žľaza). Tkanivá uvedené v zátvorkách sa vyšetrujú iba v prípade, ak je možné na ich postihnutie usudzovať na základe príznakov toxicity alebo pokiaľ súvisia s cieľovým orgánom.

Histopatologické vyšetrenie

a) Kompletné histopatologické vyšetrenie normálnej a exponovanej kože, orgánov a tkanív sa uskutoční u všetkých zvierat kontrolnej skupiny a u zvierat skupiny, ktorým bola aplikovaná najvyššia dávka.

b) Vyšetria sa všetky orgány s makroskopickými zmenami.

c) Vyšetria sa cieľové orgány zvierat ostatných dávkových skupín.

d) Ak sa použijú potkany, pľúca zvierat v skupinách s nízkou a strednou koncentráciou sa histopatologicky vyšetria k zisteniu príznakov infekcie, aby to umožnilo vhodné posúdenie zdravotného stavu zvierat. Uváži sa vhodnosť histopatologického vyšetrenia pečene a obličiek u zvierat týchto skupín. Ďalšie histopatologické vyšetrenie sa u zvierat týchto skupín nesmie uskutočňovať rutinne, musí sa však uskutočniť vždy na orgánoch, na ktorých boli zistené zmeny v skupine s najvyššou koncentráciou.

e) U zvierat satelitnej skupiny sa musia histopatologicky vyšetriť tie tkanivá a orgány, ktoré vo vystavených skupinách reagujú na testovanú látku.

2. **ÚDAJE**

Údaje by sa mali zhrnúť do tabuľky, pričom sa uvedie u každej pokusnej skupiny počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat so zmenami, druh zmien ako aj percento zvierat pre každý druh zmeny. Výsledky sa vyhodnotia vhodným štatistickým postupom. Môže byť použitá akákoľvek uznávaná štatistická metóda.

([1]) V súčasnosti známa ako sérová alanín aminotransferáza.
([2]) V súčasnosti známa ako sérová aspartát aminotransferáza.

3. **SPRÁVA**

3.1. **Správa z testu**

Správa z testu obsahuje, pokiaľ možno, tieto informácie:

— živočíšny druh, kmeň, pôvod, chovateľské podmienky, krmivo,
— podmienky testu,
— expozičné koncentrácie (včítane pomocnej látky, ak je použitá) a koncentrácie,
— údaje o toxických reakciách podľa pohlavia a dávky,
— koncentrácie bez účinku, pokiaľ je možné ju stanoviť,
— čas úmrtia počas experimentu, prípadne údaj o prežití zvierat do konca testu,
— opis toxických alebo iných účinkov,
— čas, keď boli pozorované jednotlivé abnormálne príznaky a ich ďalší vývoj,
— údaje o spotrebe potravy a o telesnej hmotnosti,
— oftalmologické nálezy,
— uskutočnené hematologické vyšetrenia a ich výsledky,
— uskutočnené biochemické vyšetrenia a ich výsledky (včítane výsledkov prípadných analýz moču),
— sekčné nálezy,
— podrobný opis všetkých histopatologických nálezov,
— štatistické vyhodnotenie výsledkov tam, kde je to možné,
— diskusia k výsledkom,
— vyhodnotenie výsledkov.

3.2. **Vyhodnotenie a interpretácia**

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

TEST TOXICITY SUBCHRONICKEJ INHALÁCIE

90 - DŇOVÝ TEST OPAKOVANÉHO INHALAČNÉHO VYSTAVENIA NA HLODAVCOCH

1. **Metóda**

1.1. **Úvod**

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. **Definície**

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.3. **Referenčné látky**

Žiadne.

1.4. **Princíp testovacej metódy**

Niekoľko skupín experimentálnych zvierat sa ovplyvňuje denne počas určeného časového intervalu odstupňovanými koncentráciami testovanej látky, jedna koncentrácia je použitá pre jednu skupinu počas obdobia 90 dní. Ak je pri vytvorení príslušnej koncentrácie testovanej látky v prostredí použitý nosič, mala by byť použitá kontrola s nosičom. Počas obdobia podávania danej látky sa zvieratá denne sledujú kvôli detekcii príznakov toxicity. Zvieratá, ktoré uhynú, sa pitvú počas testovania a na záver testovania sa pitvú zvieratá, ktoré prežili.

1.5. **Kritériá kvality**

Žiadne.

1.6. **Opis testovacej metódy**

*Príprava*

Zvieratá by mali byť prispôsobované v laboratórnych podmienkach aspoň 5 dní pred začatím experimentu. Pred testovaním sa náhodne rozdelia mladé zdravé zvieratá do kontrolných a ovplyvňovaných skupín a označia. Ak je to nevyhnutné, do testovanej látky môže byť pridaný vhodný nosič pre vytvorenie príslušnej koncentrácie látky v prostredí. Ak sú použité pri dávkovaní nosiče alebo ďalšie pomocné látky, nemali by mať toxický účinok. Môžu sa použiť údaje z literárnych zdrojov.

*Podmienky testovania*

Pokusné zvieratá

Pokiaľ nie sú známe vedľajšie účinky, odporúča sa druh potkan. Mali by sa používať mladé zdravé zvieratá bežne používaných laboratórnych kmeňov. Na začiatku testu by variabilita hmotnosti zvierat nemala presahovať ± 20 % primeranej priemernej hodnoty. Ak je testovanie subchronickej inhalácie určené ako predbežné pre dlhodobé testovanie, mali by sa použiť v oboch testoch rovnaké druhy aj kmene.

Počet a pohlavie

Pre každú koncentráciu by malo byť použitých aspoň 20 zvierat (10 samíc a 10 samcov). Samice by mali byť virgínne, negravidné. Ak sa plánuje utratiť zvieratá aj počas testu, počet zvierat by mal byť zvýšený o množstvo zvierat, ktoré sú plánované na utratenie pred ukončením testu. Navyše u doplňujúcej skupiny 20 zvierat (10 z každého pohlavia), ktorá môže byť ovplyvňovaná vysokou koncentráciou látky 90 dní, sa môže sledovať reverzibilita (návrat stavu), pretrvávanie, alebo oddialený prejav toxického účinku 28 dní po skončení expozície.

Koncentrácie vystavenia

Potrebné sú aspoň 3 koncentrácie a kontrola alebo kontrola s nosičom (zodpovedajúca najvyššej použitej koncentrácii nosiča), ak je použitý. Okrem použitia testovanej látky, so zvieratami v kontrolnej skupine by malo byť zaobchádzané identicky ako s testovanými subjektami. Najvyššia koncentrácia by mala mať toxický účinok, ale nie smrteľný. Ak je odhadnutá koncentrácia pre vystavenie ľudí, najnižšia použitá koncentrácia by mala byť vyššia. Za ideálnych podmienok by po ovplyvnení strednou koncentráciou malo byť pozorované minimálne množstvo toxických príznakov. Ak je použitých viac stredných koncentrácií, mali by byť tak odstupňované, aby postupne zvyšovali množstvo toxických príznakov. V skupinách s najnižšou, strednou koncentráciou a aj v kontrole by mal byť výskyt úmrtí nízky, aby bolo možné zmysluplné vyhodnotenie výsledkov.

Expozičná doba

Dĺžka denného vystavenia by mala byť 6 hodín po vyrovnaní koncentrácie v testovacej komore. Iné časové intervaly môžu byť použité podľa špecifických požiadaviek.

Vybavenie

Zvieratá by mali byť testované v inhalačnom zariadení vytvorenom pre udržanie aktívneho prúdu vzduchu s výmenou 12 - krát za hodinu, aby bol zaistený adekvátny obsah kyslíka a rovnomerne rozdelená ovplyvňovacia atmosféra. Ak je použitá testovacia komora, jej tvar by mal minimalizovať tiesnenie sa testovaných zvierat a umožniť maximálne ovplyvnenie inhaláciou testovanej látky. Základné pravidlo pre zaistenie stability atmosféry v testovacej komore je, že celkový objem testovaných zvierat by nemal presiahnuť 5 % objemu testovacej komory. Môžu sa použiť aj individuálne komory pre ústa a nos, len pre hlavu alebo pre celé telo, prvé dve minimalizujú prijatie látky iným spôsobom.

Doba0 pozorovania

U experimentálnych zvierat by mali byť denne sledované toxické príznaky počas celého ovplyvnenia aj počas zotavovacieho obdobia. Mal by byť zaznamenaný čas smrti a čas, keď sa objavia aj zmiznú toxické príznaky.

*Postup*

Zvieratá sú vystavené testovanej látke denne, 5 - 7 dní v týždni počas 90 dní. Zvieratá v každej doplňujúcej skupine, určené pre ďalšie pozorovanie, by mali byť sledované ďalších 28 dní bez ovplyvnenia kvôli detekcii zotavovacieho obdobia alebo pretrvávania toxického účinku. Teplota pri testovaní by mala byť udržiavaná okolo 22 ± 3 °C. Za ideálnych podmienok by mala byť udržiavaná relatívna vlhkosť medzi 30 až 70 %, ale v určitých prípadoch (napríklad testovanie aerosólov) to nemusí byť použiteľné. Voda a potrava by sa nemali podávať počas vystavenia.

Mal by sa použiť dynamický inhalačný systém s kontrolou koncentrácie. Pre stanovenie vhodných koncentrácií pre ovplyvnenie je odporúčaný skúšobný test. Prietok vzduchu by mal byť nastavený tak, aby boli zaistené homogénne podmienky v testovacej komore počas celého vystavenia. Systém by mal zaisťovať, aby stabilné podmienky ovplyvnenia boli dosiahnuté čo najrýchlejšie.

Merané alebo monitorované by mali byť:

a) miera prietoku vzduchu (nepretržite);

b) aktuálna koncentrácia testovanej látky meraná v dýchacej zóne. Počas každodenného času vystavenia by koncentrácia sa nemala meniť viac ako ± 15 % od priemernej hodnoty. V prípade prachu a aerosólov nie je táto úroveň kontroly dosiahnuteľná a môže byť akceptovaný aj širší rozsah. Počas trvania celého experimentu by rozdiel v koncentrácii medzi jednotlivými dňami mal byť čo najmenší, ako je možné prakticky dosiahnuť. Počas zostavovania systému by mala byť prevedená analýza veľkosti častíc potrebná na stanovenie stability aerosólovej koncentrácie. Počas vystavenia by sa mali analýzy vykonávať tak často, ako je potrebné na určenie hustoty distribúcie častíc;

c) teplota a vlhkosť;

d) počas expozície a po nej sa systematicky zaznamenávajú pozorovania; mali by byť zachované individuálne údaje o každom zvierati. Všetky zvieratá by mali byť sledované denne a mali by byť zaznamenávané príznaky toxicity, vrátane času objavenia, stupňa príznakov a trvania. Pozorovania v klietkach by mali zahŕňať; zmeny na koži a srsti, očiach, slizniciach, dýchací, obehový, autonómny a centrálny nervový systém, somatomotorickú aktivitu a model správania. Merania spotreby potravy a hmotnosti zvierat by mali byť vykonané každý týždeň. Pravidelné sledovanie zvierat je nevyhnutné pre istotu, že zvieratá v teste nestratíme kvôli prípadom, ako je kanibalizmus, autolýza tkanív alebo nesprávne premiestňovanie zvierat. Na konci expozičného obdobia sa všetky zvieratá, ktoré prežili, vypitvajú. Ak sa objavia umierajúce zvieratá, mali by byť utratené a vypitvané.

Na všetkých zvieratách, vrátane kontroly, sú obvykle robené nasledujúce vyšetrenia:

a) oftalmologické vyšetrenie použitím oftalmoskopu alebo podobného vhodného zariadenia by malo byť urobené pred vystavením testovanej látke a po skončení testu najlepšie u všetkých zvierat, ale aspoň pri najvyššej koncentrácii a v kontrolnej skupine. Ak sa zistia zmeny na očiach, mali by byť vyšetrené všetky zvieratá;

b) hematológia zahŕňajúca hematokrit, koncentráciu hemoglobínu, počet erytrocytov, celkový počet leukocytov a počet diferencovaných leukocytov (leukogram), meranie potenciálu zrážanlivosti, ako je čas zrážania, protrombínový čas, tromboplastínový čas, počet trombocytov, by mala byť vyšetrená na konci testovacieho obdobia;

c) klinická biochemická skúška krvi by sa mala vykonať na konci testovacieho obdobia. Rozsah vyšetrení, ktoré sa považujú za vhodné pre všetky testy, zahŕňa elektrolytickú rovnováhu, metabolizmus uhľovodíkov, funkcie pečene a obličiek. Výber špecifických vyšetrení je ovplyvnený sledovaním spôsobu účinku látky. Predpokladané sú stanovenia vápnika, fosforu, chloridov, sodíka, draslíka, glukóza na lačno (s časom hladovania primeraným druhu), sérovej glutamát-piruvát transaminázy ([1]), sérovej glutamát-oxalacetát transaminázy ([2]), ornitín dekarboxylázy, gama glutamyl transpeptidázy, močoviny, albumínu, krvného kreatinínu, celkového bilirubínu a celkového množstva proteínov v sére. Iné stanovenia, ktoré by mohli byť potrebné pre adekvátne toxikologické vyhodnotenie, zahrňujú analýzy lipidov, hormónov, pH rovnováhy, methemoglobínu a cholín esterázovej aktivity. Ak je potrebné rozšíriť vyšetrenia zistených príznakov, môžu sa pridať ďalšie klinické biochemické stanovenia;

d) analýza moču nie je bežne potrebná, len ak na ňu existujú dôvody na základe očakávanej alebo zistenej toxicity.

Ak neexistujú adekvátne staršie literárne údaje, mali by byť tieto okolnosti brané do úvahy pri stanovení parametrov hematológie a klinickej biochémie pred začatím dávkovania.

Celková pitva

Všetky zvieratá by mali byť podrobené celkovej pitve, ktorá zahŕňa vyšetrenie vonkajšieho povrchu tela, všetkých otvorov, lebečných, hrudných a brušných dutín a ich obsahu. Pečeň, obličky, nadobličky a semenníky by sa mali odvážiť čo najskôr po rozrezaní, aby sa predišlo vysychaniu. Nasledujúce orgány a tkanivá by sa mali uchovať vo vhodnom médiu pre možné budúce histopatologické vyšetrenia: všetky veľké poškodenia (lézie), pľúca – by mali byť odstránené v nepoškodenom stave, odvážené a uchované vo vhodnom fixačnom prostriedku kvôli zachovaniu štruktúry (perfúzia s fixačným prostriedkom je považovaná za účinnú metódu), nosohltanové tkanivá, mozog – vrátane predĺženej miechy/varolov most, mozočkovú a mozgovú kôru, hypofýzu, štítnu žľazu a prištítne telieska, každé tkanivo týmusu, priedušnicu, pľúca, srdce, aortu, slinné žľazy, pečeň, slezinu obličky, nadobličky, pankreas, gonády, maternicu (príslušné pohlavné orgány), (kožu), žlčník (ak je prítomný), pažerák, žalúdok, dvanástorník (duodenum), bedrovník (jejunum), lačník (ileum), slepé črevo, hrubé črevo, konečník, močový mechúr, reprezentatívnu lymfatickú uzlinu, (samičie mliečne žľazy), (stehenné svalstvo), periférne nervy, (oči), hrudnú kosť aj s kostnou dreňou, stehnovú kosť aj s povrchom kĺbu, miechu z troch častí – krčnej, strednohrudníkovej a bedrovej. Tkanivá v zátvorkách je potrebné vyšetriť, iba ak vykazujú známky toxicity alebo sú v zasiahnutom orgáne.

Histopatologické vyšetrenie

a) Kompletné histopatologické vyšetrenie by malo byť vykonané na dýchacom trakte a ostatných orgánoch a tkanivách všetkých zvierat v kontrolnej skupine a skupine ovplyvnenej najvyššou koncentráciou látky.

b) Všetky veľké poškodenia (lézie) by mali byť vyšetrené.

c) Cieľové orgány by mali byť vyšetrené aj v ostatných skupinách.

d) Pľúca zvierat zo skupín s nízkou a strednou koncentráciou by mali byť tiež podrobené histopatologickému vyšetreniu, pretože môže poskytnúť základné vyhodnotenie zdravotného stavu zvierat. Ďalšie histopatologické vyšetrenia nie sú bežne potrebné na zvieratách v týchto skupinách, ale musia byť vždy prevedené na orgánoch, ktoré vykazujú príznaky poškodenia v skupine ovplyvnenej najvyššou koncentráciou.

e) Ak je použitá aj doplňujúca (satelitná) skupina, histopatológia by mala byť urobená na tkanivách a orgánoch, ktoré vykazovali príznaky v ostatných ovplyvnených skupinách.

([1]) V súčasnosti známa ako sérová alanín aminotransferáza.
([2]) V súčasnosti známa ako sérová aspartát aminotransferáza.

2. **ÚDAJE**

Údaje by mali byť zhrnuté do tabuľky a udávať pre každú testovaciu skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat vykazujúcich poškodenia (lézie), typy poškodení a percento zvierat so všetkými typmi poškodení. Výsledky by mali byť vyhodnotené vhodnou štatistickou metódou. Môže byť použitá hociktorá uznaná štatistická metóda.

3. **SPRÁVA**

3.1. **Správa z testu**

Správa z testu má podľa možnosti obsahovať nasledujúce informácie:

— druh, kmeň, pôvod, podmienky prostredia, výživu,

— podmienky pri teste:

*Opis zariadenia na ovplyvňovanie:* vrátane tvaru, typu, rozmerov, zdroja vzduchu, systému pre vytváranie častíc a aerosólov, klimatizačného systému, odpadového vzduchu a metódy chovu zvierat v testovacích komorách, ak boli použité. Malo by byť opísané zriadenie na meranie teploty, vlhkosti a, kde je potrebné, aj stability koncentrácie aerosólov alebo veľkosti častíc.

*Údaje o vystavení:* mali by byť v tabuľkách, prezentované priemernou hodnotou a mierou variability (napr. smerodajná odchýlka) a mali by obsahovať:

a) pomer prietoku vzduchu cez inhalačné zariadenie;

b) teplotu a vlhkosť vzduchu;

c) relatívnu koncentráciu (celkové množstvo testovanej látky naplnenej do inhalačného zariadenia delené objemom vzduchu);

d) povahu nosiča, ak je použitý;

e) skutočnú koncentráciu v testovanej dýchacej zóne;

f) priemernú veľkosť častíc (kde je to vhodné),

— údaje o toxickej reakcii pre každé pohlavie a koncentráciu,

— koncentrácie bez vyvolania príznakov, ak je to možné,

— časy úmrtí počas testu alebo údaje, či zvieratá prežili po ukončení testu,

— opis toxických alebo iných príznakov,

— čas objavenia každého nenormálneho príznaku a jeho ďalší vývoj,

— údaje o výžive a hmotnosti,

— oftalmologické nálezy,

— použité hematologické testy a ich výsledky,

— použité klinické biochemické testy a ich výsledky (vrátane výsledkov každej analýzy moču),

— nálezy pitvy,

— detailný opis všetkých histopatologických nálezov,

— štatistické spracovanie výsledkov, ak je potrebné,

— diskusia o výsledkoch,

— interpretácia výsledkov.

3.2. **Vyhodnotenie a interpretácia**

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

TEST TERATOGENITY – HLODAVCE A NEHLODAVCE

## 1. METÓDA

### 1.1. Úvod

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.2. Definície

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.3. Referenčné látky

Žiadne.

### 1.4. Princíp testovacej metódy

Testovaná látka je podávaná v odstupňovaných dávkach alebo koncentráciách minimálne v tej časti gravidity, ktorá zahŕňa organogenézu v niekoľkých skupinách gravidných experimentálnych zvierat, jedna dávka v každej skupine. Krátko pred očakávaným termínom pôrodu sa samice utratia, odstráni sa maternica a vyšetrí sa jej obsah. Táto testovacia metóda stanoví toxicitu pre embryo a plod.

### 1.5. Kritériá kvality

Žiadne.

### 1.6. Opis testovacej metódy

*Príprava*

Zdravé mladé dospelé virgínne samičky v podobnom veku a veľkosti sú aklimatizované na laboratórne podmienky aspoň 5 dní pred testom, a potom sú spárené so samcami s už dokázanou plodnosťou (fertilitou). Oplodnené samičky sú náhodne rozdelené do skupín a označené.

Párenie môže prebehnúť prirodzene alebo umelou inseminániou. Testovaná látka je podávaná samiciam denne so začiatkom hneď po implantácii a v priebehu celej organogenézy. Deň pred termínom je plod vybratý hysterektómiou a vyšetrený na abnormality kostry a vnútorností, vrátane spomalenia rastu, oneskorenie osifikácie a črevné hemoragie.

*Podmienky testovania*

Pokusné zvieratá

Bežne používané druhy sú potkan, myš, škrečok a králik. Preferované druhy sú potkan a králik. Používajú sa bežné laboratórne kmene. Kmene by nemali mať nízku plodnosť a mala by byť u nich známa reakcia na teratogén. Zvieratá by mali byť v klietkach samostatne.

Počet a pohlavie

Pre každú dávku je potrebných aspoň 20 gravidných potkanov, myší alebo škrečkov alebo 12 gravidných králikov. Pre objektívne vyhodnotenie teratogénneho potenciálu látky je potrebné zaistiť dostatočný počet vrhov a mláďat.

Testované dávky

Mali by byť použité aspoň 3 testované dávky a kontrola. Ak je testovaná látka podávaná s nosičom, mala by byť použitá kontrolná skupina s nosičom. Ak je použitý nosič, mali by byť známe jeho vlastnosti; nemal by mať teratogénny účinok alebo vplyv na reprodukciu. Okrem použitia testovanej látky, so zvieratami v kontrolnej skupine by sa malo zaobchádzať identicky ako s testovanými subjektami. Ak neexistuje nejaké

obmedzenie kvôli fyzikálnej/chemickej povahe alebo biologickým vlastnostiam testovanej látky, najvyššia dávka by v ideálnom prípade mala indukovať niektoré viditeľné príznaky toxicity u matky, ako je slabý úbytok hmotnosti, ale nie viac ako 10 % úmrtnosť matiek. Najnižšia dávka by nemala indukovať pozorovateľné príznaky spôsobené testovanou látkou. Stredná dávka by mala tvoriť geometrický stred medzi najvyššou a najnižšou dávkou.

Limitný test

V prípade látky s nízkou toxicitou, ak dávka aspoň 1 000 mg/kg neindukuje teratogenitu alebo žiadne toxické príznaky na embryo, sledovanie ďalších dávok nie je nevyhnutné.

Doba vystavenia

Deň 0 je deň, keď je pozorovaná vaginálna zátka a/alebo spermie (ak je to možné). Doba dávkovania by mala pokrývať obdobie hlavnej organogenézy. Môže to byť od 6. dňa do 15. u potkana a myši, od 6. do 14. dňa u škrečka alebo od 6. do 18. dňa u králika. Ak deň 0 je založený na sledovaní párenia alebo na umelej inseminácii, stanovený čas by mal byť upravený pridaním jedného dňa. Alternatívne, doba podávania by mala byť predĺžená o približne jeden deň pred očakávaným termínom vrhu.

Doba pozorovania

Podrobné klinické vyšetrenia by mali byť robené každý deň aspoň raz. Ďalšie pozorovania by mali byť robené denne vhodnými spôsobmi, aby boli minimalizované straty zvierat počas testovania.

*Postup*

Testovaná látka je denne podávaná orálne, žalúdkovou sondou. Testovaná látka by mala byť podávaná denne približne v tom istom čase.

Testované samičky sú ovplyvňované testovanou látkou denne počas primeranej expozičnej doby. Veľkosť dávky môže závisieť od hmotnosti samičiek na začiatku podávania látky alebo alternatívne s ohľadom na rapídne priberanie počas gravidity by zvieratá mali byť opakovane vážené a dávka by mala byť závislá od momentálnej hmotnosti. Príznaky toxicity by sa mali zaznamenávať hneď po objavení, vrátane času objavenia, stupňa a dĺžky trvania. Samice prejavujúce príznaky potratu alebo predčasného vrhu by mali byť utratené a podrobené detailnému makroskopickému vyšetreniu. Obdobie pozorovania po vystavení by malo pokračovať približne do jedného dňa do termínu vrhu; objektívne je pokryť väčšinu obdobia gravidity, ale vyhnúť sa komplikovanej interpretácii výsledkov, ktoré by mohli vzniknúť nasledovným prirodzeným pôrodom. Pozorovania v klietkach by mali zahŕňať zmeny na koži a srsti, očiach, slizniciach ako aj dýchací, obehový, autonómny a centrálny nervový systém, somatomotorickú aktivitu a model správania. Spotreba potravy a hmotnosť zvierat by mala byť meraná každý týždeň.

Pitva

Po smrti, počas alebo na konci testovania by mali byť samice makroskopicky vyšetrené na všetky štruktúrne abnormality alebo patologické zmeny, ktoré môžu mať vplyv na graviditu. Okamžite po smrti by sa mala odobrať maternica a vyšetriť mŕtve embryá a plody a určiť počet živých plodov. Zvyčajne je možné určiť čas intrauterínnej smrti plodu. V potkanoch a králikoch sa môže zisťovať množstvo žltých teliesok (*corpora lutea*). Malo by byť určené pohlavie plodov, plody by mali byť individuálne odvážené, hmotnosti zaznamenané a vypočítaná priemerná hmotnosť plodu. Po odobratí by sa mal každý plod vyšetriť zvonka. Pri potkanoch, myšiach a škrečkoch by mala byť vypreparovaná jedna tretina až jedna polovica každého vrhu a vyšetrená na anomálie kostry a zvyšná časť každého vrhu by mala byť vhodnými metódami vyšetrená na anomálie v mäkkých tkanivách. Pri králikoch by mal byť každý plod vyšetrený opatrnou disekciou na abnormality vnútorností, a potom vyšetrený na anomálie kostry.

2. **ÚDAJE**

Údaje by sa mali zhrnutúť do tabuľky a udávať pre každú testovaciu skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat, ktoré dosiahli graviditu, počet a percento živých plodov a plodov s anomáliami mäkkých tkanív alebo abnormalitami kostry vzhľadom ku konkrétnym vrhom. Výsledky by mali byť vyhodnotené vhodnou štatistickou metódou. Môže sa použiť hociktorá uznaná štatistická metóda.

3. **SPRÁVA**

3.1. **Správa z testu**

Správa z testu má podľa možnosti obsahovať nasledujúce informácie:

— druh, kmeň, pôvod, podmienky prostredia, výživa,
— podmienky pri teste,
— veľkosť dávky (vrátane nosiča, ak bol použitý) a koncentrácie,
— údaje o toxickej reakcii pri jednotlivých dávkach,
— dávku bez toxickej reakcie (ak je to reálne),
— časy úmrtí počas testu alebo údaje či zvieratá prežili po ukončení testu,
— opis toxických alebo iných príznakov,
— čas objavenia každého abnormálneho príznaku a jeho ďalší vývoj,
— údaje o výžive a hmotnosti,
— trvanie gravidity a údaje o vrhoch (vrátane historických údajov),
— údaje o plodoch (živé/mŕtve, pohlavie, defekty mäkkých tkanív a kostry),
— údaje o vrhoch (živé/mŕtve, pohlavie, defekty mäkkých tkanív a kostry v každom vrhu),
— štatistické spracovanie výsledkov,
— diskusia o výsledkoch,
— interpretácia výsledkov.

3.2. **Vyhodnotenie a interpretácia**

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

TEST CHRONICKEJ TOXICITY

## 1. METÓDA

### 1.1. Úvod

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.2. Definície

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.3. Referenčné látky

Žiadne.

### 1.4. Princíp testovacej metódy

Testovaná látka je podávaná vhodným spôsobom v niekoľkých skupinách pokusných zvierat počas väčšej dĺžky ich života, a to sedem dní v týždni, jedna dávka na jednu skupinu. Počas a po ovplyvnení testovanou látkou sú u experimentálnych zvierat denne sledované toxické príznaky.

### 1.5. Kritériá kvality

Žiadne.

### 1.6. Opis testovacej metódy

*Príprava*

Zvieratá sú udržiavané v laboratórnych podmienkach aspoň 5 dní pred začatím experimentu. Pred testovaním sa náhodne rozdelia mladé zdravé zvieratá do kontrolných a exponovaných skupín a označia.

*Podmienky testovania*

Pokusné zvieratá

Preferovaným druhom je potkan. Na základe výsledkov predchádzajúcich testovaní iných zvierat (hlodavcov alebo nehlodavcov) môžu byť použité aj iné druhy. Mali by sa použiť bežné laboratórne kmene mladých zdravých zvierat a podávanie testovanej látky by sa malo začať čo najskôr po odstavení od matky.

Na začiatku testu by variabilita hmotnosti zvierat nemala presahovať ± 20 % vhodnej priemernej hodnoty. Ak sa robí sub-chronický orálny test ako predbežný k dlhodobému testu, mali by byť použité v oboch testoch rovnaké druhy alebo línie.

Počet a pohlavie

Pri hlodavcoch by malo byť použitých aspoň 40 zvierat (20 samíc a 20 samcov) pre každú dávku aj súbežnú kontrolu. Samice by mali byť virgínne, negravidné. Ak sa plánujú počas testu utratenia zvierat, počet zvierat by mal byť zvýšený o plánovaný počet zvierat, ktoré majú byť utratené pred ukončením testu.

Pre nehlodavce je akceptovateľné menšie množstvo zvierat, ale aspoň štyri z jedného pohlavia pre každú skupinu.

Dávkovanie a frekvencia vystavení

Okrem súbežnej kontrolnej skupiny by mali byť použité aspoň tri rôzne dávky. Najvyššia dávka by mala vyvolať jednoznačné toxické príznaky, ale nespôsobiť príliš vysokú úmrtnosť. Najnižšia dávka by nemala vyvolať viditeľné toxické príznaky.

Stredná dávka alebo dávky by mali byť stanovené v strede intervalu medzi najvyššou a najnižšou dávkou.

Výber dávok môže byť odhadnutý z údajov z predchádzajúcich sledovaní a testov toxicity.

Bežné je denné vystavenie. Ak je chemikália podávaná v pitnej vode alebo primiešaná do potravy, voda a potrava mali by byť k dispozícii nepretržite.

Kontroly

Mali by byť použité súbežné kontrolné skupiny, ktoré sú identické v každom ohľade s vytavenými skupinami, okrem podávanej testovanej látky.

Za špeciálnych okolností ako je použitie aerosólov v inhalačných testoch alebo použitie emulgátorov s neurčenou biologickou aktivitou v orálnych testoch by sa mala použiť súbežná negatívna kontrolná skupina. Negatívna kontrolná skupina je vystavená rovnakým spôsobom ako testované skupiny, okrem testovanej látky a nosiča (ak je použitý).

Spôsob podávania

Dva základné spôsoby podávania sú orálne a inhalácia. Výber spôsobu podávania závisí na fyzikálnych a chemických vlastnostiach testovanej látky a je závislý na pravdepodobnom vystavení ľudí.

Použitie kožnej (dermálnej) aplikácie spôsobuje značné praktické problémy. Systematická chronická toxicita, ktorá je výsledkom kožnej absorbcie, môže byť bežne odvodená z výsledkov orálnych testov a poznatkov o rozsahu kožnej absorbcie, odvodených z predchádzajúcich testov toxicity.

Orálne testy

Ak je testovaná látka absorbovaná z gastrointestinálneho traktu a ak je prehltnutie jeden zo spôsobov, ako môže byť ovplyvnený človek, pokiaľ nie sú vedľajšie účinky, je odporúčaný orálny spôsob podávania.

Zvieratá môžu prijímať testovanú látku v potrave, rozpustenú v pitnej vode, alebo podávanú v kapsuliach.

Ideálne by malo byť použité denné dávkovanie počas siedmych dní v týždni, pretože dávkovanie počas piatich dní v týždni by mohlo spôsobiť zotavenie alebo ústup toxických príznakov v čase nedávkovania, a to ovplyvní výsledok a ďalšie hodnotenie. Z praktického hľadiska je však prípustné aj dávkovanie päť dní v týždni.

Inhalačné testy

Pretože inhalačné testy predstavujú technický problém pre ich väčšiu komplikovanosť v porovnaní s inými spôsobmi podávania, je namieste detailnejší návod pre tento spôsob podávania testovanej látky. Je nutné poznamenať, že vnútropriedušnicová injekcia (infúzia) môže byť za špecifickej situácie opodstatnenou alternatívou.

Vzorom pre dlhodobé testy sú obyčajne predpokladané vystavenia ľudí, čo znamená denné vystavenie zvierat šesť hodín po vyrovnaní koncentrácie v inhalačnej komore, päť dní v týždni (prerušované vystavenie) alebo pri pravdepodobnom vystavení z prostredia 22 až 24 hodinové vystavenie sedem dní v týždni (nepretržité vystavenie), pričom je plánovaná jedna hodina na kŕmenie a údržbu komory v rovnakom čase. V oboch prípadoch sú zvieratá obyčajne vystavené stálou koncentráciou testovanej látky. Podstatný rozdiel medzi prerušovaným a nepretržitým vystavením je, že pri prvom spôsobe je 17 až 18 - hodinový interval, v ktorom sa môžu zvieratá zotaviť z príznakov denného vystavenia dokonca s ešte dlhším intervalom na zotavenie cez víkendy.

Výber prerušovaného alebo nepretržitého vystavenia závisí od cieľov testu a ľudského vystavenia, ktoré je simulované v testoch. Musia sa brať do úvahy aj určité technické problémy. Napríklad výhody nepretržitého vystavenia pri simulácii podmienok prostredia sa negujú nevyhnutnosťou kŕmenia a napájania počas vystavenia a potrebou zložitejších (spoľahlivých) aerosólov, vytvárania pary a tiež technikou monitorovania.

Komory pre vystavenie

Zvieratá by mali byť testované v inhalačných komorách, ktoré umožňujú aktívny prúd vzduchu s výmenou 12 - krát za hodinu, aby bol zaistený adekvátny obsah kyslíka a rovnomerne rozdelená ovplyvňovacia atmosféra. Kontrolné komory a komory pre vystavenie by mali mať rovnakú konštrukciu a tvar kvôli zaisteniu porovnateľných podmienok pre ovplyvnenie vo všetkých ohľadoch, okrem testovanej látky. Jemný podtlak vo vnútri komory je bežne udržiavaný pre zabránenie rozptylu testovanej látky do okolitého prostredia. Komory by mali minimalizovať tiesnenie testovaných zvierat. Základné pravidlo pre zaistenie stability atmosféry v testovacej komore je, že celkový objem testovaných zvierat by nemal presiahnuť 5 % objemu testovacej komory.

Merané a monitorované by mali byť:

i) Prúd vzduchu: miera prietoku vzduchu cez komoru by mala byť, pokiaľ je možné, meraná nepretržite;

ii) Koncentrácia: počas každodenného času vystavenia by sa koncentrácia testovanej látky nemala odchyľovať viac ako ± 15 % od priemernej hodnoty;

iii) Teplota a vlhkosť: pre hlodavce by mala byť udržiavaná teplota 22 ± 2°C a vlhkosť v komore 30 až 70 % okrem prípadu, keď je použitá voda na rozptýlenie testovanej látky v atmosfére testovacej komory. Pokiaľ je možné, obe veličiny by mali byť monitorované nepretržite;

iv) Meranie veľkosti častíc: mala by byť určená veľkosť rozptýlených častíc v atmosfére komory, vrátene kvapalných alebo pevných aerosólov. Aerosólové častice by mali mať dýchateľnú veľkosť pre použité testované zvieratá. Vzorky atmosféry v testovacej komore by mali byť otestované v dýchacej zóne zvierat. Vzorka vzduchu by mala reprezentovať distribúciu častíc, ktorou sú zvieratá ovplyvňované a mala by byť gravimetricky stanovená pre všetky suspendované aerosóly, aj keď mnoho aerosólov nie je dýchateľných. Analýza veľkosti častíc by mala byť stanovovaná často počas zostavovania testovacieho systému kvôli zaisteniu stability aerosólov a potom tak často, ako je nevyhnutné počas ovplyvnenia stanoviť zhodnosť distribúcie častíc, ktorými sú ovplyvňované zvieratá.

Trvanie testu

Testovaná látka by sa mala podávať aspoň 12 mesiacov.

*Postup*

Pozorovania

Podrobné klinické vyšetrenia by mali byť robené aspoň raz denne. Ďalšie pozorovania by mali byť denne robené vhodnými spôsobmi, aby bolo minimum strát zvierat počas testu, napríklad pitva alebo uchovanie v chlade nájdených mŕtvych zvierat a izolácia alebo utratenie slabých alebo chradnúcich zvierat. Podrobné pozorovania by mali robiť na odhalenie nástupu a priebehu všetkých toxických príznakov, ako aj minimalizovanie straty v dôsledku chorôb, autolýzy alebo kanibalizmu.

Klinické príznaky, vrátane neurologických a očných zmien, rovnako ako aj mortalita, by mali byť zaznamenané pre všetky zvieratá. Mal by byť zaznamenaný čas nástupu a priebeh toxických príznakov, vrátane podozrivých tumorov.

Hmotnosť zvierat by sa mala zaznamenávať individuálne pre všetky zvieratá raz za týždeň prvých 13 týždňov testovania a potom najmenej raz za štyri týždne. Príjem potravy by mal byť stanovovaný raz za týždeň počas prvých 13 týždňov testovania a potom približne v trojmesačných intervaloch, pokiaľ to nie je nutné zmeniť kvôli zdravotnému stavu alebo zmene hmotnosti.

Hematologické vyšetrenie

Hematologické vyšetrenie (napr. obsah hemoglobínu, hematokrit, množstvo červených krviniek, množstvo bielych krviniek, krvných doštičiek a ďalšie merania zrážanlivosti) by sa mali robiť po treťom, po šiestom mesiaci a potom približne v šesťmesačných intervaloch a na konci na krvných vzorkách zozbieraných zo všetkých nehlodavcov a z 10 potkanov z každého pohlavia zo všetkých skupín. Mali by byť, ak je to možné, z tých istých potkanov v každom intervale. Navyše z nehlodavcov by mali byť vzorky zozbierané aj pred testom.

Ak z klinických vyšetrení vyplýva zhoršenie zdravotného stavu zvierat počas testu, mal by sa urobiť krvný obraz u postihnutých zvierat.

Krvný obraz sa robí na vzorkách zvierat v skupine s najvyššou dávkou a v kontrole. Pre skupiny s nižšou dávkou sa robí iba, ak je veľký rozdiel medzi skupinou s najvyššou dávkou a kontrolou, alebo ak sú zistené patologické nálezy.

Analýza moču

Zo všetkých nehlodavcov a z 10 potkanov z každého pohlavia zo všetkých skupín by mali by byť zozbierané vzorky moču na analýzu, ak je to možné, v každom odbere z tých istých potkanov podobne ako pri hematologickom vyšetrení. Nasledujúce údaje by mali byť pri hlodavcoch robené individuálne pre každé zviera alebo na spojenej vzorke pre každé pohlavie a skupinu:

— vonkajšie hodnotenie: objem a hustota pre každé zviera,

— proteíny, glukóza, ketóny, krv alebo krvné farbivo (semikvantitatívne),

— mikroskopické vyšetrenie sedimentu (semikvantitatívne).

Biochemické vyšetrenia

Približne v šesťmesačných intervaloch a na konci testu sa odoberú vzorky krvi zo všetkých nehlodavcov a z 10 potkanov z každého pohlavia zo všetkých skupín na biochemické vyšetrenie, ak je to možné, v každom odbere z tých istých potkanov. Navyše z nehlodavcov by mali vzorky zozbierané aj pred testom. Zo vzoriek sa pripraví plazma a stanovia sa nasledujúce hodnoty:

— koncentrácia celkových proteínov,

— koncentrácia albumínu,

— pečeňové testy (ako aktivita alkalickej fosfatázy, glutamát-piruvát transaminázy ([1]), sérovej glutamát-oxalacetát transaminázy ([2])), gama glutamyl transpeptidázy, ornitín dekarboxylázy,

— metabolizmus uhľovodíkov ako glukóza na lačno,

— testy funkcie obličiek ako močovina v krvi.

Celková pitva

Všetky zvieratá by mali byť podrobené celkovej pitve, vrátane tých, ktoré uhynuli počas experimentu alebo boli utratené, lebo chradli. Pred utratením by sa mali odobrať vzorky krvi zo všetkých zvierat pre stanovenie krvného obrazu. Všetky výrazne viditeľné poškodenia (lézie), tumory alebo poškodenia (lézie) podozrivé na tumor by mali byť zafixované. Sledovanie nálezov pitvy by malo korelovať s mikroskopickými nálezmi.

Všetky orgány a tkanivá by sa mali zafixovať pre histopatologické vyšetrenie. Týka sa to zvyčajne nasledujúcich orgánov a tkanív: mozog ([3]) (predĺžená miecha/varolov most, mozočková a mozgová kôra), hypofýza, štítna žľaza (vrátane prištítnych teliesok), týmus, pľúca (vrátane priedušnice), srdce, aorta, slinné žľazy, pečeň ([3]), slezina, obličky ([3]), nadobličky ([3]), pažerák, žalúdok, dvanástorník (duodenum), bedrovník (jejunum), lačník (ileum), slepé črevo, hrubé črevo, konečník, maternica, močový mechúr, lymfatické uzliny, pankreas, gonády ([3]), (prídavné pohlavné orgány), samičie mliečne žľazy, kožu, svalstvo, periférne nervy, miecha (krčná, hrudná, bedrová), hrudná kosť aj s kostnou dreňou, stehnová kosť (vrátane kĺbu) a oči. Naplnenie pľúc a močového mechúra fixačným činidlom je optimálny spôsob zachovania týchto tkanív, naplnenie pľúc pri inhalačných testoch je nevyhnutné pre primerané histopatologické vyšetrenia. Pri špeciálnych testoch ako sú inhalačné testy, by mal byť preskúmaný dýchací trakt, vrátane nosa, hltana a hrtana.

Ak sa vykonávajú aj iné klinické vyšetrenia, mali by byť výsledky z nich dostupné pred mikroskopickým vyšetrením, pretože môžu poskytnúť dôležité informácie pre patológa.

Histopatológia

Všetky viditeľné zmeny, obzvlášť tumory a ostatné poškodenia (lézie), ktoré nastali v hociktorom orgáne, by mali byť mikroskopicky vyšetrené. Odporúčaný je nasledujúci postup:

a) Mikroskopické vyšetrenie všetkých zafixovaných orgánov a tkanív s kompletným opisom všetkých poškodení nájdených:

   1. vo všetkých zvieratách, ktoré zahynuli alebo boli utratené počas testu;

   2. vo všetkých zvieratách v skupine s najvyššou dávkou a v kontrole;

b) Orgány a tkanivá vykazujúce abnormality spôsobené alebo pravdepodobne spôsobené testovanou látkou sa tiež vyšetrujú v skupinách s nižšími dávkami;

c) Ak výsledky testu dokazujú značné zníženie dĺžky života zvierat alebo indukciu príznakov, ktoré môžu ovplyvniť toxickú odpoveď, mala by sa vyšetriť aj skupina s druhou najnižšou dávkou podľa predchádzajúceho opisu;

d) Informácie o výskyte poškodení (lézií), bežne sa vyskytujúcich u použitých laboratórnych kmeňov zvierat v rovnakých laboratórnych podmienkach, t. j. kontrolné dáta z predchádzajúcich testov sú nevyhnutné pre správne posúdenie významnosti zmien sledovaných u testovaných zvierat.

([1]) V súčasnosti známa ako sérová alanín aminotransferáza.
([2]) V súčasnosti známa ako sérová aspartát aminotransferáza.
([3]) Tieto orgány od desiatich zvierat z jedného pohlavia a skupiny hlodavcov a všetkých nehlodavcov by mali byť odvážené spolu so štítnou žľazou (s prištítnymi telieskami) všetkých nehlodavcov.

2. **ÚDAJE**

Údaje by mali byť zhrnuté v tabuľke a udávať pre každú testovaciu skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat vykazujúcich poškodenia (lézie) a percento zvierat so všetkými typmi poškodení. Výsledky by mali byť vyhodnotené vhodnou štatistickou metódou. Môže byť použitá hociktorá uznaná štatistická metóda.

3. **SPRÁVA**

3.1. **Správa z testu**

Správa z testu podľa možnosti obsahuje nasledujúce informácie:

— druh, kmeň, pôvod, podmienky prostredia, výživu,

— podmienky pri teste:

Opis expozičného zariadenia:

vrátane tvaru, typu, rozmerov, zdroja vzduchu, systému pre vytváranie častíc a aerosólov, klimatizačného systému, spracovania odpadového vzduchu a metódy chovu zvierat v testovacích komorách, ak boli použité. Malo by byť opísané zriadenie na meranie teploty, vlhkosti a kde je potrebné, aj stability koncentrácie aerosólov alebo veľkosti častíc.

Údaje vystavenia:

mali by byť v tabuľkách, s uvedením priemernej hodnoty a miery variability (napr. smerodajnej odchýlky) a mali by obsahovať:

a) pomer prietoku vzduchu cez inhalačné zariadenie;

b) teplotu a vlhkosť vzduchu;

c) relatívnu koncentráciu (celkové množstvo testovanej látky naplnenej do inhalačného zariadenia delené objemom vzduchu);

d) povahu nosiča, ak je použitý;

e) aktuálnu koncentráciu v testovanej dýchacej zóne;

f) strednú veľkosť častíc (kde je to vhodné),

— veľkosti dávok (vrátane nosiča, ak bol použitý) a koncentrácie,

— údaje o toxickej reakcii pre každé pohlavie a dávku,

— dávku bez toxickej reakcie, ak je to reálne,

— časy úmrtí počas pozorovania alebo údaje, či zvieratá prežili po ukončení testu,

— opis toxických alebo iných príznakov,

— čas objavenia každého nenormálneho príznaku a jeho ďalší vývoj,

— údaje o výžive a hmotnosti,

— oftalmologické nálezy,

— použité hematologické testy a všetky ich výsledky,

— použité klinické biochemické testy a všetky ich výsledky (vrátane výsledkov každej analýzy moču),

— nálezy pitvy,

— detailný opis všetkých histopatologických nálezov,

— štatistické spracovanie výsledkov, ak je potrebné,

— diskusiu o výsledkoch,

— interpretáciu výsledkov.

3.2. **Vyhodnotenie a interpretácia**

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

TEST KARCINOGENITY

## 1. METÓDA

### 1.1. Úvod

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.2. Definície

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.3. Referenčné látky

Žiadne.

### 1.4. Princíp testovacej metódy

Testovaná látka je podávaná obyčajne sedem dní v týždni vhodným spôsobom v niekoľkých skupinách pokusných zvierat, jedna dávka na jednu skupinu počas väčšej dĺžky ich života. Počas a po ovplyvnení testovanou látkou sú u experimentálnych zvierat denne sledované príznaky toxicity, obzvlášť vznik tumorov.

### 1.5. Kritériá kvality

Žiadne.

### 1.6. Opis testovacej metódy

Zvieratá sú udržiavané v laboratórnych podmienkach aspoň 5 dní pred začatím experimentu. Pred testovaním sa náhodne rozdelia mladé zdravé zvieratá do kontrolných a exponovaných skupín a označia.

Pokusné zvieratá

Na základe predchádzajúcich výsledkov môžu byť použité aj iné druhy (hlodavce aj nehlodavce). Mali by sa používať mladé zdravé zvieratá bežne používaných laboratórnych kmeňov a dávkovanie by sa malo začať čo najskôr po odstavení od matky.

Na začiatku testu by odchýlka hmotnosti zvierat nemala presahovať ± 20 % priemernej hodnoty. Ak sa robí sub-chronický orálny test ako predbežný pre dlhodobý test, mali by sa použiť v oboch testoch rovnaké druhy/línie a kmene.

Počet a pohlavie

Pri hlodavcoch by sa malo použiť aspoň 100 zvierat (50 samíc a 50 samcov) pre každú dávku aj súbežnú kontrolu. Samice by mali byť virgínne, negravidné. Ak je v pláne utratiť nejaké zvieratá aj počas testu, počet by mal byť zvýšený o plánovaný počet zvierat, ktoré majú byť utratené pred ukončením testu.

Dávkovanie a frekvencia expozície

Okrem súbežnej kontrolnej skupiny by mali byť použité aspoň tri rôzne dávky. Najvyššia dávka by mala vyvolať minimálne príznaky toxicity ako slabé zníženie hmotnosti (menej ako ± 10 %). Zmeny v dĺžke života by nemali byť spôsobené inými vplyvmi, ako sú tumory.

Najnižšia dávka by nemala mať vplyv na normálny rast, vývin a dlhovekosť zvierat ani vyvolávať žiadne toxické príznaky. Všeobecne by nemala byť nižšia ako 10 % najvyššej dávky.

Stredná dávka alebo dávky by mali byť stanovené v strede intervalu medzi najvyššou a najnižšou dávkou.

Výber dávok môže byť odhadnutý z údajov z predchádzajúcich sledovaní a testov toxicity.

Bežná frekvencia ovplyvňovania je denná. Ak je chemikália podávaná v pitnej vode alebo primiešaná do potravy, voda a potrava by mali byť k dispozícii nepretržite.

Kontroly

Mali by byť použité súbežné kontrolné skupiny, ktoré sú identické v každom ohľade s ovplyvňovanými skupinami, okrem podávanej testovanej látky.

Za špeciálnych okolností ako sú inhalačné testy aerosólov alebo použitie emulgátorov s neurčenou biologickou aktivitou v orálnych testoch, by mala byť použitá ďalšia kontrolná skupina, ktorá nie je vystavená ani použitým nosičom.

Spôsob podávania

Tri základné spôsoby podávania sú orálne, kožné (dermálne) a inhalácia. Výber spôsobu podávania závisí na fyzikálnych a chemických vlastnostiach testovanej látky a je pravdepodobný pre vystavenie človeka.

Orálne testy

Ak je testovaná látka absorbovaná z gastro-intestinálneho traktu a ak je prehltnutie jeden zo spôsobov, ako môže byť vystavený človek, pokiaľ nie sú vedľajšie účinky, je odporúčaný orálny spôsob podávania. Zvieratá môžu prijímať testovanú látku v potrave, rozpustenú v pitnej vode, alebo podávanú v kapsuliach.

V ideálnom prípade by sa malo použiť denné dávkovanie počas sedem dní v týždni, pretože dávkovanie počas päť dní v týždni by mohlo spôsobiť zotavenie alebo ústup toxicity v čase nedávkovania a to ovplyvní výsledok a ďalšie hodnotenie. Z praktického hľadiska je však prijateľné aj dávkovanie päť dní v týždni.

Kožné (dermálne) testy

Vystavenie kože jej natieraním môže byť vybraté kvôli simulácii hlavného spôsobu vystavenia človeka a tiež ako modelový systém pre indukciu kožných poškodení (lézií).

Inhalačné testy

Pretože inhalačné testy predstavujú technický problém pre ich väčšiu komplikovanosť v porovnaní s inými spôsobmi podávania, je namieste detailnejší návod pre tento spôsob podávania testovanej látky. Je nutné poznamenať, že vnútroprieduśnicová injekcia (infúzia) môže byť opodstatnenou alternatívou za špecifickej situácie.

Vzorom pre dlhodobé testy sú obyčajne predpokladané vystavenia ľudí, čo znamená denné vystavenie zvierat šesť hodín po vyrovnaní koncentrácie v inhalačnej komore, päť dní v týždni (prerušované vystavenia), alebo pri pravdepodobnom vystavení z prostredia 22 až 24 - hodinové vystavenie denne sedem dní v týždni (nepretržité vystavenie), každý deň je v ten istý čas vyhradená jedna hodina na kŕmenie a údržbu testovacej komory. V oboch prípadoch sú zvieratá obyčajne ovplyvňované stálou koncentráciou testovanej látky.

Podstatný rozdiel medzi prerušovaným a nepretržitým vystavením je, že v prvom je 17 až 18 - hodinový interval, v ktorom sa môžu zvieratá zotaviť z príznakov denného vystavenia dokonca s ešte dlhším intervalom na zotavenie cez víkendy.

Výber prerušovaného alebo nepretržitého vystavenia závisí od cieľov testu a ľudského vystavenia, ktoré je simulované v testoch. Musia sa brať do úvahy aj určité technické problémy. Napríklad výhody nepretržitého vystavenia pri simulácii podmienok prostredia sa negujú nevyhnutnosťou kŕmenia a napájania počas vystavenia a potrebou zložitejších (spoľahlivých) aerosólov, vytvárania pary a tiež technikou monitorovania.

Komory pre vystavenie

Zvieratá by mali byť testované v inhalačných komorách vytvorených pre udržanie aktívneho prúdu vzduchu s výmenou 12 - krát za hodinu, aby bol zaistený adekvátny obsah kyslíka a rovnomerne rozdelená ovplyvňovacia atmosféra. Kontrolné komory a komory na vystavenie by mali mať rovnakú konštrukciu a tvar kvôli zaisteniu porovnateľných podmienok pre vystavenie vo všetkých ohľadoch, okrem testovanej látky. Jemný podtlak vo vnútri komory je bežne udržiavaný pre zabránenie rozptylu testovanej látky do okolitého prostredia. Komory by mali minimalizovať tiesnenie testovaných zvierat. Základné pravidlo pre zaistenie stability atmosféry v testovacej komore je, že celkový objem testovaných zvierat by nemal presiahnuť 5 % objemu testovacej komory.

Merať a monitorovať by sa mali:

i) Prúd vzduchu: pomer prietoku vzduchu cez komoru by mal byť, pokiaľ je možné, meraný nepretržite;

ii) Koncentrácia: počas každodenného času vystavenia by sa koncentrácia testovanej látky nemala odchyľovať viac ako ± 15 % od priemernej hodnoty. Počas celkového trvania testu by sa mala koncentrácia zo dňa na deň udržiavať konštantne, ako to je len možné;

iii) Teplota a vlhkosť: pre hlodavce by mala byť udržiavaná teplota 22 ± 2°C a vlhkosť v komore 30 až 70 %, okrem prípadu, keď je použitá voda na rozptýlenie testovanej látky v atmosfére testovacej komory. Pokiaľ je možné, obe veličiny by mali byť monitorované nepretržite;

iv) Meranie veľkosti častíc: mala by byť určená veľkosť rozptýlených častíc v atmosfére komory, vrátene kvapalných alebo pevných aerosólov. Aerosólové častice by mali mať dýchateľnú veľkosť pre použité testované zvieratá. Vzorky atmosféry v testovacej komore by mali byť otestované v dýchacej zóne zvierat. Vzorka vzduchu by mala reprezentovať distribúciu častíc, ktorou sú zvieratá ovplyvňované a mala by byť určená gravimetrickým stanovením pre všetky suspendované aerosóly, aj keď mnoho aerosólov nie je dýchateľných. Analýza veľkosti častíc by mala byť prevádzaná často počas zostavovania testovacieho systému kvôli zaisteniu stability aerosólov, a potom tak často, ako je nevyhnutné, počas ovplyvnenia stanoviť zhodnosť distribúcie častíc, ktorými sú ovplyvňované zvieratá.

Trvanie testu

Trvanie testu karcinogenity zahŕňa väčšiu časť normálnej dĺžky života testovaných zvierat. Ukončenie testu by malo byť po 18 mesiacoch u myši a škrečka a po 24 mesiacoch u potkana; pri určitých kmeňoch zvierat s väčšou dĺžkou života a/alebo s nízkym spontánnym výskytom tumorov by sa mal test ukončiť po 24 mesiacoch u myši a škrečka a po 30 mesiacoch u potkana. Alternatívne, takéto predĺžené sledovanie je prijateľné, ak počet prežívajúcich zvierat v skupine s najnižšou dávkou alebo kontrole dosahuje 25 %. Pri ukončení testu, kde je výrazný rozdiel v odpovedi rôznych pohlaví, by sa malo hodnotiť každé pohlavie oddelene. Ak len skupina s najväčšou dávkou hynie predčasne na jasné následky toxicity, nie je dôvod na ukončenie testu za predpokladu, že prejav toxicity nie je problémom v ostatných skupinách. Pri negatívnych výsledkoch testu nie je prijateľná väčšia strata ako 10 % v každej skupine z dôvodu autolýzy, kanibalizmu alebo technických problémov a prežívanie všetkých skupín nie je nižšie ako 50 % počas 18 mesiacov u myši a škrečka a 24 mesiacov u potkana.

*Postup*

Pozorovania

Denné pozorovania v klietkach by mali zahŕňať; zmeny na koži a srsti, očiach, slizniciach ako aj dýchacieho, obehového, autonómneho a centrálneho nervového systému, somatomotorickú aktivitu a model správania.

Pravidelné pozorovania sú nevyhnutné pre zabezpečenie, že počet zvierat nebude klesať počas testu z dôvodov kanibalizmu, autolýzy tkanív a nesprávneho premiestňovania. Chradnúce zvieratá by mali byť utratené a vypitvané.

Klinické príznaky a mortalita by mala byť zaznamenávaná pri všetkých zvieratách. Špeciálna pozornosť sa musí venovať vzniku tumorov: mal by byť zaznamenaný čas vzniku, lokalizácia, rozmery, výzor a rast výrazne viditeľných alebo hmatateľných tumorov.

Počas prvých 13 týždňov pozorovania by mala byť meraná spotreba potravy (a vody ak je testovaná látka podávaná v pitnej vode) týždenne, a potom približne v trojmesačných intervaloch, pokiaľ to nie je potrebné zmeniť kvôli zdravotnému stavu alebo zmene hmotnosti.

Hmotnosť zvierat by mala byť zaznamenávaná individuálne pre všetky zvieratá raz za týždeň prvých 13 týždňov testovania a potom najmenej raz za štyri týždne.

*Klinické vyšetrenia*

Hematológia

Ak testovanie v klietkach predpokladá zhoršenie zdravia zvierat počas testu, mal by sa robiť krvný obraz postihnutých zvierat.

Po 12 a 18 mesiacoch a pred utratením je potrebné urobiť krvné stery zvierat. Krvný obraz sa urobí na vzorkách zo zvierat v skupine s najvyššou dávkou a v kontrole. Ak údaje, zvlášť tie získané pred utratením alebo údaje z patologických skúšok, naznačujú nevyhnutnosť, mal by sa urobiť krvný obraz aj pre skupinu (-y) s nižšou dávkou.

Celková pitva

Všetky zvieratá by mali byť podrobené celkovej pitve, vrátane tých, ktoré zahynuli počas experimentu alebo boli utratené, lebo chradli. Všetky výrazne viditeľné tumory a poškodenia (lézie) alebo poškodenia (lézie) podozrivé na tumor by mali byť zafixované.

Všetky orgány a tkanivá by sa mali fixovať vo vhodných médiách pre možné budúce histopatologické vyšetrenia: mozog (vrátane časti predĺženej miechy/varolov most, mozočková a mozgová kôra), hypofýza, štítna žľaza (vrátane prištítnych teliesok), každé tkanivo týmusu, priedušnica a pľúca, srdce, aorta, slinné žľazy, pečeň, slezina, obličky, nadobličky, pankreas, gonády, maternica, prídavné pohlavné orgány, kožu, pažerák, žalúdok, dvanástorník (duodenum), bedrovník (jejunum), lačník (ileum), slepé črevo, hrubé črevo, konečník, močový mechúr, zástupcu lymfatických uzlín, samičie mliečne žľazy, stehenné svalstvo, periférne nervy, hrudná kosť aj s kostnou dreňou, stehnová kosť (vrátane kĺbu), miecha z troch častí (krčná, stredno-hrudníková, bedrová) a oči.

Naplnenie pľúc a močového mechúra fixačným činidlom je optimálny spôsob zachovania týchto tkanív: naplnenie pľúc pri inhalačných testoch je nevyhnutné pre primerané histopatologické vyšetrenia. Pri inhalačných testoch mal by byť uchovaný celý dýchací trakt, vrátane nosných dutín, hltana a hrtana.

Histopatológia

a) Kompletné histopatologické vyšetrenie by malo byť urobené na orgánoch a tkanivách všetkých zvierat, ktoré zahynuli alebo boli utratené počas testu a všetkých zvierat v kontrolnej skupine a v skupine s najvyššou dávkou.

b) Všetky viditeľné tumory a poškodenia (lézie) alebo poškodenia (lézie) podozrivé na tumor by mali byť vyšetrené mikroskopicky vo všetkých skupinách.

c) Ak je významný rozdiel vo výskyte neoplastických (rakovinových) poškodení (lézií) v skupine s najvyššou dávkou v porovnaní s kontrolou, malo by byť urobené histopatologické vyšetrenie obzvlášť na postihnutých orgánoch alebo tkanivách aj v ostatných skupinách.

d) Ak je prežívanie v skupine s najvyššou dávkou podstatne nižšie ako v kontrole, mala by byť kompletne vyšetrená aj skupina s druhou najvyššou dávkou.

e) Ak je v skupine s najvyššou dávkou dôkaz toxických alebo iných príznakov, ktoré môžu mať vplyv na rakovinovú odpoveď, mala by byť kompletne vyšetrená aj skupina s druhou najvyššou dávkou.

## 2. ÚDAJE

Údaje by mali byť zhrnuté do tabuľky a udávať pre každú testovaciu skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat vykazujúcich tumory objavené počas testu, čas ich objavenia a počet zvierat s tumormi objavenými po pitve. Výsledky by mali byť vyhodnotené vhodnou štatistickou metódou. Môže byť použitá hociktorá uznaná štatistická metóda.

## 3. SPRÁVA

### 3.1. Správa z testu

Správa z testu má podľa možnosti obsahovať nasledujúce informácie:

— druh, kmeň, pôvod, podmienky prostredia, výživu,

— podmienky pri teste:

Opis zariadenia pre vystavenie:

vrátane tvaru, typu, rozmerov, zdroja vzduchu, systému pre vytváranie častíc a aerosólov, klimatizačný systém, spracovanie odpadového vzduchu a metódy chovu zvierat v testovacích komorách, ak boli použité. Malo by byť opísané zriadenie na meranie teploty, vlhkosti a, kde je potrebné, aj stability koncentrácie aerosólov alebo veľkosti častíc.

Údaje o vystavení:

mali by byť v tabuľkách, s uvedením priemernej hodnoty a miery variability (napr. smerodajnej odchýlky) a mali by obsahovať:

a) pomer prietoku vzduchu cez inhalačné zariadenie;

b) teplotu a vlhkosť vzduchu;

c) relatívnu koncentráciu (celkové množstvo testovanej látky naplnenej do inhalačného zariadenia delené objemom vzduchu);

d) povahu nosiča, ak je použitý;

e) aktuálnu koncentráciu v testovanej dýchacej zóne;

f) strednú veľkosť častíc (kde je to vhodné),

— veľkosti dávok (vrátane nosiča, ak bol použitý) a koncentrácie,

— výskyt tumorov podľa pohlavia, dávky a typu tumoru,

— časy úmrtí počas pozorovania alebo údaje, či zvieratá prežili po ukončení testu,

— údaje o toxickej reakcii pre každé pohlavie a dávku,

— opis toxických alebo iných príznakov,

— čas objavenia každého nenormálneho príznaku a jeho ďalší vývoj,

— údaje o výžive a hmotnosti,

— použité hematologické testy a všetky ich výsledky,

— nálezy pitvy,

— detailný opis všetkých histopatologických nálezov,

— štatistické spracovanie výsledkov a opis použitých metód,

— diskusia o výsledkoch,

— interpretácia výsledkov.

3.2. **Vyhodnotenie a interpretácia**

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

KOMBINOVANÝ TEST CHRONICKEJ TOXICITY/KARCINOGENITY

## 1. METÓDA

### 1.1. Úvod

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.2. Definície

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.3. Referenčné látky

Žiadne.

### 1.4. Princíp testovacej metódy

Cieľom kombinovaného testu chronickej toxicity/karcinogenity je zistiť chronické a karcinogénne účinky látky pre človeka po predĺženom vystavení.

Z tohto dôvodu je test karcinogenity doplnený najmenej jednou satelitnou vystavenou skupinou a satelitnou kontrolnou skupinou. Dávky použité v satelitnej skupine s vysokou dávkou môžu byť vyššie ako sú použité v skupine s najvyššou dávkou pri teste karcinogenity. U zvierat v teste karcinogenity sa sleduje celková toxicita ako aj karcinogénna odpoveď. U zvierat v satelitnej vystavenej skupine sa sleduje celková toxicita.

Testovaná látka je bežne podávaná sedem dní v týždni vhodným spôsobom v niekoľkých skupinách pokusných zvierat, jedna dávka na jednu skupinu počas väčšej dĺžky ich života. Počas a po vystavení testovanej látke sú u pokusných zvierat denne sledované príznaky toxicity a vznik tumorov.

### 1.5. Kritériá kvality

Žiadne.

### 1.6. Opis testovacej metódy

Zvieratá sú udržiavané v laboratórnych podmienkach aspoň 5 dní pred začatím experimentu. Pred testovaním sa náhodne rozdelia mladé zdravé zvieratá do kontrolných a vystavených skupín a označia.

Pokusné zvieratá

Preferovaným druhom je potkan. Na základe výsledkov predchádzajúcich testovaní iných zvierat (hlodavcov alebo nehlodavcov) môžu byť použité aj iné druhy. Mali by byť použité bežné laboratórne kmene mladých zdravých zvierat a dávkovanie by sa malo začať čo najskôr po odstavení od matky.

Na začiatku testu by variabilita hmotnosti zvierat nemala presahovať ± 20 % primeranej priemernej hodnoty. Ak sa robí sub-chronické orálne testovanie ako predbežné k dlhodobým testom, mali by byť použité v oboch testoch rovnaké druhy alebo línie/kmene.

Počet a pohlavie

Pri hlodavcoch by malo byť použitých aspoň 100 zvierat (50 samíc a 50 samcov) pre každú dávku aj súbežnú kontrolu. Samice by mali byť virgínne negravidné. Ak je v pláne utratiť nejaké zvieratá aj počas testu, počet by mal byť zvýšený o plánovaný počet zvierat, ktoré majú byť utratené pred ukončením testu.

Vystavená satelitná skupina alebo skupiny pre iné patologické vyšetrenia ako nádorové by mala mať 20 zvierat z každého pohlavia, zatiaľ čo satelitná kontrolná skupina 10 zvierat z každého pohlavia.

Dávkovanie a frekvencia expozície

Na účely testu karcinogenity by mali byť okrem súbežnej kontrolnej skupiny použité aspoň tri rôzne dávky. Najvyššia dávka by mala vyvolať minimálne príznaky toxicity ako slabé zníženie hmotnosti (menej ako ± 10 %). Zmeny v dĺžke života by nemali byť spôsobené inými vplyvmi ako sú tumory.

Najnižšia dávka by nemala mať vplyv na normálny rast, vývin a dlhovekosť zvierat ani vyvolávať žiadne toxické príznaky. Všeobecne by nemala byť nižšia ako 10 % najvyššej dávky.

Stredná dávka alebo dávky by mali byť stanovené v strednom intervale medzi najvyššou a najnižšou dávkou.

Výber dávok môže byť odhadnutý z údajov z predchádzajúcich sledovaní a testov toxicity.

Na účely testu chronickej toxicity sa pridáva do experimentu ďalšia vystavená a súbežná satelitná kontrolná skupina. Najvyššia dávka pre satelitnú vystavenú skupinu zvierat by mala spôsobovať jednoznačné toxické príznaky.

Bežná frekvencia ovplyvňovania je denná. Ak je chemikália podávaná v pitnej vode alebo primiešaná do jedla, mali by byť k dispozícii nepretržite.

Kontroly

Mali by sa použiť súbežné kontrolné skupiny, ktoré sú identické v každom ohľade s vystavenými skupinami okrem podávanej testovanej látky.

Za špeciálnych okolností ako sú inhalačné testy aerosólov alebo použitie emulgátorov s neurčenou biologickou aktivitou v orálnych testoch mala by sa použiť ďalšia kontrolná skupina, ktorá nie je vystavená ani použitým nosičom.

Spôsob podávania

Tri základné spôsoby podávania sú orálne, kožné (dermálne) a inhalácia. Výber spôsobu podávania závisí od fyzikálnych a chemických vlastností testovanej látky a je pravdepodobný pre vystavenie človeka.

Orálne testy

Ak je testovaná látka absorbovaná z gastrointestinálneho traktu a ak je prehltnutie jedným zo spôsobov ako môže byť vystavený človek, pokiaľ nie sú vedľajšie účinky, odporúča sa orálny spôsob podávania. Zvieratá môžu prijímať testovanú látku v potrave, rozpustenú v pitnej vode, alebo podávanú v kapsuliach. Ideálne by malo byť použité denné dávkovanie počas siedmych dní v týždni, pretože dávkovanie počas piatich dní v týždni by mohlo spôsobiť zotavenie alebo ústup toxicity v čase nedávkovania, a to ovplyvní výsledok a ďalšie hodnotenie. Z praktického hľadiska je však prijateľné aj dávkovanie päť dní v týždni.

Kožné (dermálne) testy

Vystavenie kože natieraním môže byť vybraté kvôli simulácii hlavného spôsobu vystavenia človeka a tiež ako modelový systém pre indukciu kožných poškodení (lézií).

Inhalačné testy

Pretože inhalačné testy predstavujú technický problém pre ich väčšiu komplikovanosť v porovnaní s inými spôsobmi podávania, vyžadujú detailnejší návod pre tento spôsob podávania testovanej látky. Je nutné poznamenať, že vnútropriedušnicová injekcia (infúzia) môže byť opodstatnenou alternatívou za špecifickej situácie.

Vzorom pre dlhodobé testy sú obyčajne predpokladané vystavenia ľudí, čo znamená denné vystavenie zvierat šesť hodín po vyrovnaní koncentrácie v inhalačnej komore, päť dní v týždni (prerušované vystavenie) alebo pri pravdepodobnom vystavení z prostredia 22 až 24 - hodinové vystavenie denne sedem dní v týždni (nepretržité vystavenie), každý deň je v ten istý čas vyhradená jedna hodina na kŕmenie a údržbu testovacej komory. V oboch prípadoch sú zvieratá obyčajne vystavené stálej koncentrácii testovanej látky. Podstatný rozdiel medzi prerušovaným a nepretržitým vystavením je, že v prvom je 17 až 18 - hodinový interval, v ktorom sa môžu zvieratá zotaviť z príznakov denného vystavenia dokonca s ešte dlhším intervalom na zotavenie cez víkendy.

Výber prerušovaného alebo nepretržitého vystavenia závisí od cieľov testu a ľudskej expozície, ktorá je simulovaná v testoch. Musia sa brať do úvahy aj určité technické problémy. Napríklad výhody nepretržitého vystavenia pri simulácii podmienok prostredia sa negujú nevyhnutnosťou kŕmenia a napájania počas vystavenia a potrebou zložitejších (spoľahlivých) aerosólov, vytvárania pary a tiež technikou monitorovania.

Komory pre vystavenie

Zvieratá by mali byť testované v inhalačných komorách vytvorených pre udržanie aktívneho prúdu vzduchu s výmenou 12 - krát za hodinu, aby bol zaistený adekvátny obsah kyslíka a rovnomerne rozdelená ovplyvňovacia atmosféra. Kontrolné komory a komory na vystavenie by mali mať rovnakú konštrukciu a tvar kvôli zaisteniu porovnateľných podmienok pre ovplyvnenie vo všetkých ohľadoch okrem testovanej látky. Jemný podtlak vo vnútri komory je bežne udržiavaný pre zabránenie rozptylu testovanej látky do okolitého prostredia. Komory by mali minimalizovať tiesnenie testovaných zvierat. Základné pravidlo pre zaistenie stability atmosféry v testovacej komore je, že celkový objem testovaných zvierat by nemal presiahnuť 5 % objemu testovacej komory.

Merať a monitorovať by sa mali:

i) Prúd vzduchu: pomer prietoku vzduchu cez komoru by mal byť, pokiaľ je možné, meraný nepretržite;

ii) Koncentrácia: počas každodenného času vystavenia by sa koncentrácia testovanej látky nemala odchyľovať viac ako ± 15 % od priemernej hodnoty. Počas celkového trvania testu by mala byť koncentrácia zo dňa na deň udržiavaná konštantne, ako je to len možné;

iii) Teplota a vlhkosť: pre hlodavce by mala byť udržiavaná teplota 22 ± 2°C a vlhkosť v komore 30 až 70 % okrem prípadu, keď je použitá voda na rozptýlenie testovanej látky v atmosfére testovacej komory. Pokiaľ je možné, obe veličiny by sa mali monitorovať nepretržite;

iv) Meranie veľkosti častíc: mala by byť určená veľkosť rozptýlených častíc v atmosfére komory, vrátene kvapalných alebo pevných aerosólov. Aerosólové častice by mali mať dýchateľnú veľkosť pre použité testované zvieratá. Vzorky atmosféry v testovacej komore by mali byť otestované v dýchacej zóne zvierat. Vzorka vzduchu by mala reprezentovať distribúciu častíc, ktorou sú zvieratá ovplyvňované a mala by byť určená gravimetrickým meraním pre všetky suspendované aerosóly, aj keď mnoho aerosólov nie je dýchateľných. Analýza veľkosti častíc by sa mala robiť často počas zostavovania testovacieho systému kvôli zaisteniu stability aerosólov a potom tak často, ako je nevyhnutné počas vystavenia stanoviť zhodnosť distribúcie častíc, ktorým sú zvieratá vystavené.

Trvanie testu

Trvanie testu karcinogenity zahŕňa väčšiu časť normálnej dĺžky života testovaných zvierat. Ukončenie testu by malo byť po 18 mesiacoch u myši a škrečka a po 24 mesiacoch u potkana; pri určitých kmeňoch zvierat s väčšou dĺžkou života a/alebo s nízkym spontánnym výskytom tumorov by sa mal test ukončiť po 24 mesiacoch u myši a škrečka a po 30 mesiacoch u potkana. Alternatívne, takéto predĺžené sledovanie je prijateľné, ak počet prežívajúcich zvierat v skupine s najnižšou dávkou alebo v kontrolnej skupine dosahuje 25 %. Pri ukončení testu, kde je výrazný rozdiel v odpovedi rôznych pohlaví, by sa malo hodnotiť každé pohlavie oddelene. Ak len skupina s najväčšou dávkou hynie predčasne na jasné následky toxicity, nie je dôvod na ukončenie testu za predpokladu, že prejav toxicity nie je problémom v ostatných skupinách. Pri negatívnych výsledkoch testu nie je prijateľná väčšia ako 10 % strata v každej skupine v experimente z dôvodu autolýzy, kanibalizmu alebo technických problémov a prežívanie všetkých skupín nie je nižšie ako 50 % počas 18 mesiacov u myši a škrečka a 24 mesiacov u potkana.

Satelitná skupina 20 vystavených zvierat z každého pohlavia a 10 zodpovedajúcich kontrolných zvierat z každého pohlavia, ktorá sa použije na test chronickej toxicity, by sa mala testovať najmenej 12 mesiacov. Tieto zvieratá sú po utratení určené na patologické vyšetrenia účinku testovanej látky na nekomplikované starecké (gerontologické) zmeny.

*Postup*

Pozorovania

Denné pozorovania v klietkach by mali zahŕňať; zmeny na koži a srsti, očiach, slizniciach ako aj dýchacieho, obehového, autonómneho a centrálneho nervového systému, somatomotorickú aktivitu a model správania.

Klinické vyšetrenia by sa mali robiť vo vhodných intervaloch aj na zvieratách v satelitnej vystavenej skupine alebo skupinách.

Pravidelné pozorovania sú nevyhnutné, aby počet zvierat neklesal počas testu z dôvodov kanibalizmu, autolýzy tkanív a nesprávneho premiestňovania. Chradnúce zvieratá by mali byť utratené a vypitvané.

Klinické príznaky, vrátane neurologických a očných zmien, rovnako ako aj mortalita, by mali byť zaznamenané pre všetky zvieratá. Špeciálna pozornosť sa musí venovať vzniku tumorov: mal by byť zaznamenaný čas vzniku, lokalizácia, rozmery, výzor a rast výrazne viditeľných alebo hmatateľných tumorov; mal by sa zaznamenať čas nástupu a priebeh toxických príznakov.

Počas prvých 13 týždňov pozorovania by mala byť meraná spotreba potravy (a vody ak je testovaná látka podávaná v pitnej vode) týždenne, a potom približne v trojmesačných intervaloch, pokiaľ to nie je potrebné zmeniť kvôli zdravotnému stavu alebo zmene hmotnosti.

Hmotnosť zvierat by mala byť zaznamenávaná individuálne pre všetky zvieratá raz za týždeň prvých 13 týždňov testovania a potom najmenej raz za štyri týždne.

*Klinické vyšetrenia*

Hematológia

Hematologické vyšetrenie (napr. obsah hemoglobínu, hematokrit, množstvo červených krviniek, množstvo bielych krviniek, krvných doštičiek, a ďalšie merania zrážanlivosti) by mali byť robené po treťom, po šiestom mesiaci a potom približne v šesťmesačných intervaloch a na konci testu na krvných vzorkách zozbieraných z 10 potkanov z každého pohlavia zo všetkých skupín. Mali by byť, ak je to možné, z tých istých potkanov v každom intervale.

Ak z klinických vyšetrení vyplýva zhoršenie zdravotného stavu zvierat počas testu, mal by sa urobiť krvný obraz u postihnutých zvierat.

Krvný obraz sa robí na vzorkách zvierat v skupine s najvyššou dávkou a v kontrole. Pre skupiny s nižšou dávkou sa robí iba, ak je veľký rozdiel medzi skupinou s najvyššou dávkou a kontrolou, alebo ak sú zistené patologické nálezy.

Analýza moču

Mali by sa zbierať vzorky moču na analýzu z 10 potkanov z každého pohlavia zo všetkých skupín, ak je to možné v každom odbere z tých istých potkanov, podobne ako pri hematologickom vyšetrení. Nasledujúce údaje by mali byť pri hlodavcoch robené individuálne pre každé zviera alebo na spojenej vzorke pre každé pohlavie a skupinu:

— vonkajšie hodnotenie: objem a hustota pre každé zviera,

— proteíny, glukóza, ketóny, krv alebo krvné farbivo (semikvantitatívne),

— mikroskopické vyšetrenie sedimentu (semikvantitatívne).

Biochemické testy

Približne v šesťmesačných intervaloch a na konci testu by sa mali odoberať vzorky krvi zo všetkých nehlodavcov a z 10 potkanov z každého pohlavia zo všetkých skupín na biochemické vyšetrenie, ak je to možné v každom odbere z tých istých potkanov. Navyše z nehlodavcov by mali vzorky zozbierané aj pred testom. Zo vzoriek sa pripraví plazma a stanovia sa nasledujúce hodnoty:

— koncentrácia celkových proteínov,

— koncentrácia albumínu,

— pečeňové testy (ako aktivita alkalickej fosfatázy, glutamát-piruvát transaminázy ([1]), sérovej glutamát-oxalacetát transaminázy ([2])), gama glutamyl transpeptidázy, ornitín dekarboxylázy,

— metabolizmus uhľovodíkov ako glukóza na lačno,

— testy funkcie obličiek ako močovina v krvi.

([1]) V súčasnosti známa ako sérová alanín aminotransferáza.
([2]) V súčasnosti známa ako sérová aspartát aminotransferáza.

Celková pitva

Všetky zvieratá by sa mali podrobiť celkovej pitve, vrátane tých, ktoré uhynuli počas experimentu alebo boli utratené, lebo chradli. Pred utratením by mali byť odobrané vzorky krvi zo všetkých zvierat pre stanovenie krvného obrazu. Všetky výrazne viditeľné poškodenia (lézie), tumory alebo poškodenia (lézie) podozrivé na tumor by mali byť zafixované. Sledovanie nálezov pitvy by malo korelovať s mikroskopickými nálezmi.

Všetky orgány a tkanivá by sa mali zafixovať pre histopatologické vyšetrenie. Týka sa to zvyčajne nasledujúcich orgánov a tkanív: mozog ([1]) (predĺžená miecha/varolov most, mozočková a mozgová kôra), hypofýza, štítna žľaza (vrátane prištítnych teliesok), týmus, pľúca (vrátane priedušnice), srdce, aorta, slinné žľazy, pečeň ([1]), slezina, obličky ([1]), nadobličky ([1]), pažerák, žalúdok, dvanástorník (duodenum), bedrovník (jejunum), lačník (ileum), slepé črevo, hrubé črevo, konečník, maternica, močový mechúr, lymfatické uzliny, pankreas, gonády ([1]), (prídavné pohlavné orgány), samičie mliečne žľazy, kožu, svalstvo, periférne nervy, miecha (krčná, hrudná, bedrová), hrudná kosť aj s kostnou dreňou, stehnová kosť (vrátane kĺbu) a oči.

Naplnenie pľúc a močového mechúra fixačným činidlom je optimálny spôsob zachovania týchto tkanív, naplnenie pľúc pri inhalačných testoch je nevyhnutné pre primerané histopatologické vyšetrenia. Pri špeciálnych testoch ako sú inhalačné testy, by mal byť preskúmaný dýchací trakt, vrátane nosa, hltana a hrtana.

Ak sa vykonávajú aj iné klinické vyšetrenia, mali by byť výsledky z nich dostupné pred mikroskopickým vyšetrením, pretože môžu poskytnúť dôležité informácie pre patológa.

Histopatológia

Pre časť testu na chronickú toxicitu:

Podrobné vyšetrenia by sa mali urobiť na všetkých fixovaných orgánoch všetkých zvierat zo satelitnej skupiny s najvyššou dávkou a v kontrole. Ak sa v satelitnej skupine s vysokou dávkou zistili patologické nálezy podmienené testovanou chemickou látkou, mali by byť na konci experimentu predmetom kompletného detailného histologického vyšetrenia cieľové orgány všetkých ostatných zvierat vo všetkých satelitných vystavených skupinách, ako aj z vystavených skupín z časti testu pre karcinogenitu.

Pre časť testu na karcinogenitu:

a) Kompletné histopatologické vyšetrenie by malo byť urobené na orgánoch a tkanivách všetkých zvierat, ktoré zahynuli alebo boli utratené počas testu a všetkých zvierat v kontrolnej skupine a v skupine s najvyššou dávkou;

b) Všetky viditeľné tumory alebo poškodenia (lézie) podozrivé na tumor vo všetkých skupinách na všetkých orgánoch by mali byť vyšetrené mikroskopicky;

c) Ak je významný rozdiel vo výskyte neoplastických (rakovinových) poškodení (lézií) v skupine s najvyššou dávkou v porovnaní s kontrolou, malo by byť urobené histopatologické vyšetrenie obzvlášť na postihnutých orgánoch alebo tkanivách aj v ostatných skupinách;

d) Ak je prežívanie v skupine s najvyššou dávkou podstatne nižšie ako v kontrole, mala by byť kompletne vyšetrená aj skupina s druhou najvyššou dávkou;

e) Ak je v skupine s najvyššou dávkou dôkaz toxických alebo iných príznakov, ktoré môžu mať vplyv na rakovinovú odpoveď, mala by byť kompletne vyšetrená aj skupina s druhou najvyššou dávkou.

## 2. ÚDAJE

Údaje by mali byť zhrnuté v tabuľke a udávať pre každú testovaciu skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat vykazujúcich tumory alebo toxické príznaky počas testu, čas nástupu a počet zvierat, u ktorých boli zistené tumory po usmrtení. Výsledky by mali byť vyhodnotené vhodnou štatistickou metódou. Môže byť použitá hociktorá uznaná štatistická metóda.

## 3. SPRÁVA

### 3.1. Správa z testu

Správa z testu má podľa možnosti obsahovať nasledujúce informácie:

— druh, kmeň, pôvod, podmienky prostredia, výživu,

([1]) Tieto orgány od desiatich zvierat z jedného pohlavia a skupiny hlodavcov a všetkých nehlodavcov by mali byť odvážené.

— podmienky pri teste:

Opis zariadenia na ovplyvňovanie:

vrátane tvaru, typu, rozmerov, zdroja vzduchu, systému pre vytváranie častíc a aerosólov, klimatizačný systém, spracovanie odpadového vzduchu a metódy chovu zvierat v testovacích komorách, ak boli použité. Malo by byť opísané zriadenie na meranie teploty, vlhkosti a, kde je potrebné, aj stability koncentrácie aerosólov alebo veľkosti častíc.

Údaje o vystavení:

mali by byť v tabuľkách, s uvedením priemernej hodnoty a miery variability (napr. smerodajnej odchýlky) a mali by obsahovať:

a) pomer prietoku vzduchu cez inhalačné zariadenie;

b) teplotu a vlhkosť vzduchu;

c) relatívnu koncentráciu (celkové množstvo testovanej látky naplnenej do inhalačného zariadenia delené objemom vzduchu);

d) povahu nosiča, ak je použitý;

e) aktuálnu koncentráciu v testovanej dýchacej zóne;

f) strednú veľkosť častíc (kde je to vhodné),

— veľkosti dávok (vrátane nosiča, ak bol použitý) a koncentrácie,

— výskyt tumorov podľa pohlavia, dávky a typu tumoru,

— časy úmrtí počas pozorovania alebo údaje, či zvieratá prežili po ukončení testu,

— údaje o toxickej reakcii pre každé pohlavie a dávku,

— opis toxických alebo iných príznakov,

— čas objavenia každého nenormálneho príznaku a jeho ďalší vývoj,

— oftalmologické nálezy,

— údaje o výžive a hmotnosti,

— použité hematologické testy a všetky ich výsledky,

— použité klinické biochemické testy a všetky ich výsledky (vrátane výsledkov každej analýzy moču),

— nálezy pitvy,

— detailný opis všetkých histopatologických nálezov,

— štatistické spracovanie výsledkov a opis použitých metód,

— diskusiu o výsledkoch,

— interpretáciu výsledkov.

3.2. **Vyhodnotenie a interpretácia**

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

JEDNOGENERAČNÝ REPRODUKČNÝ TEST TOXICITY

1. **METÓDA**

1.1. **Úvod**

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. **Definície**

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.3. **Referenčné látky**

Žiadne.

1.4. **Princíp testovacej metódy**

Testovaná látka je podávaná v odstupňovaných dávkach v niekoľkých skupinách samcov a samíc. Samce by mali byť ovplyvňované počas rastu a najmenej jeden úplný cyklus spermatogenézy (približne 56 dní u myší a 70 dní u potkanov) s cieľom vyvolať testovanou látkou nepriaznivé účinky na spermatogenézu.

Samice parentálnej (P) generácie by mali byť vystavené po dobu aspoň dvoch kompletných ovulačných cyklov s cieľom vyvolať testovanou látkou nepriaznivé účinky na ovuláciu. Potom sa zvieratá spária. Testovaná látka sa podáva obom pohlaviam počas periódy párenia a potom len samiciam počas gravidity a počas laktácie.

Pre inhalačné vystavenie je potrebné túto metódu modifikovať.

1.5. **Kritériá kvality**

Žiadne.

1.6. **Opis testovacej metódy**

*Príprava*

Pred testom sú zdravé mladé dospelé zvieratá náhodne rozdelené do skupín vystavenia a kontrolných skupín a označené. Zvieratá sú držané v experimentálnych laboratórnych podmienkach aspoň 5 dní pred testom.

Odporúča sa podávať testovanú látku v potrave alebo v pitnej vode. Ostatné spôsoby podávania sú tiež prijateľné. Všetky zvieratá by mali byť vystavené rovnakým spôsobom počas primeranej doby experimentu. Ak sú nosiče alebo ďalšie pomocné látky použité pri dávkovaní, nemali by mať toxický efekt.

Dávkovanie by malo byť sedem dní v týždni.

Pokusné zvieratá

Výber druhov

Preferované druhy sú myš a potkan. Mali by byť použité zdravé zvieratá, ktoré neboli predmetom žiadnych testov. Nemali by byť použité kmene s nízkou plodnosťou. Zvieratá by mali byť charakterizované vo vzťahu k druhu, kmeňu, pohlaviu, hmotnosti a/alebo veku.

Samce aj samice by mali byť primerane vyšetrené na stanovenie plodnosti. Všetky testované aj kontrolné zvieratá by mali pred začiatkom podávania testovanej látky odstavené od matky.

Počet a pohlavie

Každá vystavená aj kontrolná skupina by mala obsahovať dostatočný počet zvierat, čo znamená asi 20 gravidných samíc v čase vrhu alebo krátko pred ním.

Cieľom je získať dosť gravidít a potomstva pre zabezpečenie zmysluplného vyhodnotenia potenciálneho účinku testovanej látky na plodnosť, graviditu a správanie matky v P generácii a na kojené mláďatá, rast a vývin $F_1$ potomstva po odstavení od matky.

Podmienky testu

Potrava a voda by sa mali poskytovať ľubovoľne (*ad libidum*). Tesne pred vrhom by mali byť samice separované v pôrodných klietkach alebo v klietkach pre matky s poskytnutým materiálom pre hniezdenie.

Testované dávky

Mali by byť použité aspoň 3 testované dávky a kontrola. Ak je nosič použitý pre podávanie testovanej látky, kontrolná skupina by mala dostávať nosič v najväčšom použitom objeme. Ak testovaná látka spôsobuje redukciu príjmu potravy alebo jej metabolizmu, je potrebné pouvažovať o použití zodpovedajúcej kontrolnej skupiny. V ideálnom prípade, ak neexistuje nejaké obmedzenie kvôli fyzikálnej/chemickej povahe alebo biologickým vlastnostiam testovanej látky, najvyššia dávka by mala indukovať toxické príznaky, ale nie mortalitu v parentálnej (P) generácii. Stredná dávka alebo dávky by mali indukovať minimálne toxické príznaky spôsobené testovanou látkou a najnižšia dávka by nemala indukovať žiadne pozorovateľné nepriaznivé účinky na rodičov alebo potomkov. Ak sa určená dávka podáva sondou alebo v kapsuliach, dávka by mala byť závislá na individuálnej hmotnosti zvierat a prispôsobovaná každý týždeň zmenám hmotnosti. Pre samice počas gravidity môže dávka závisieť od hmotnosti v nultom alebo šiestom dni gravidity, ak je potrebné.

Limitný test

V prípade látky s nízkou toxicitou, ak dávka aspoň 1 000 mg/kg neindukuje žiadne negatívne vplyvy na reprodukčnú schopnosť, sledovanie ďalších dávok nie je nevyhnutné. Ak predbežné pokusy s najvyššou dávkou a jasnými toxickými príznakmi na matku nevykazujú nepriaznivý účinok na plodnosť, sledovanie ďalších dávok nie je nevyhnutné.

*Vykonanie testu*

Experimentálny plán

Začiatok denného dávkovania samcom parentálnej (P) generácie by mal byť v piatom až deviatom týždni života, keď by mali byť odstavení od matky a aklimatizovaní aspoň päť dní. U potkanov dávkovanie pokračuje 10 týždňov do periódy párenia (pre myši osem týždňov). Samce môžu byť utratené a vyšetrené na konci periódy párenia alebo môžu byť držané na testovanej diéte pre možnosť druhého vrhu a môžu byť utratené a vyšetrené niekedy na konci pozorovania. Pre parentálne (P) samice sa dávkovanie začína aspoň po piatich dňoch aklimatizácie a pokračuje aspoň dva týždne pred párením. Denné dávkovanie P samíc by malo pokračovať počas trojtýždňovej periódy párenia, gravidity až do odstavenia F1 potomstva. Do úvahy by sa mala brať modifikácia dávkovacieho plánu na základe iných dostupných informácií o testovanej látke, ako je indukcia metabolizmu alebo bioakumulácia.

Postup pri párení

V reprodukčnom teste toxicity sa môžu použiť pomery párenia 1: 1 (jeden samec a jedna samica) alebo 1: 2 (jeden samec a dve samice).

Pri pomere párenia 1: 1 samica môže byť umiestnená s tým istým samcom, kým sa neprejaví gravidita alebo uplynú tri týždne. Každé ráno by mali byť samice vyšetrené na prítomnosť spermií alebo vaginálnej zátky. Deň 0 gravidity je definovaný ako deň, keď je spozorovaná vaginálna zátka alebo spermie.

Pri bezvýslednom párení by mali byť zvieratá vyšetrené na príčinu neplodnosti. To znamená možnosť ďalšieho párenia s inými samcami alebo samicami, prípadne mikroskopické vyšetrenie reprodukčných orgánov a overenie ovulačného cyklu alebo spermatogenézy.

Veľkosť vrhu

Ovplyvňovanie zvierat počas testu poskytuje normálnu možnosť vrhu a výchovu potomstva do štádia odstavenia od matky bez štandardizácie vrhov.

Ak je urobená štandardizácia, predpokladajú sa nasledovné postupy. Medzi dňom 1 a 4 po narodení je veľkosť každého vrhu upravená elimináciou plodov navyše a to selekciou štyroch samcov a štyroch samíc v jednom vrhu. Ak počet samcov a samíc neumožňuje získať štyri zvieratá z každého pohlavia v jednom vrhu, je akceptovateľná čiastočná úprava (napríklad päť samcov a tri samice). Úprava je nereálna pre vrhy s menej ako ôsmimi plodmi.

Pozorovania

Počas testovacieho obdobia by malo byť každé zviera pozorované denne aspoň raz. Mali by byť zaznamenané nápadné zmeny správania, príznaky ťažkého alebo oneskoreného vrhu a všetky toxické príznaky, vrátane úmrtnosti. V období pred párením a počas párenia by mala byť denne meraná spotreba potravy. Po vrhu a počas laktácie by mala byť meraná spotreba potravy (a spotreba vody ak je testovaná látka podávaná v pitnej vode) v ten istý deň ako váženie vrhu. P samce a samice by mali byť odvážené prvý deň dávkovania a potom raz týždenne. Tieto pozorovania by mali byť zaznamenávané individuálne pre každé dospelé zviera.

Trvanie gravidity sa počíta odo dňa 0 gravidity. Každý vrh by sa mal čo najskôr po pôrode vyšetriť a stanoviť množstvo a pohlavie plodov, potratov (mŕtvych plodov) živých plodov a prítomnosť výrazných anomálií.

Mŕtve plody a plody utratené v deň 4 by sa mali fixovať a vyšetriť na možné defekty. Živé plody by sa mali spočítať a vrhy odvážiť ráno hneď po narodení, na 4. a 7. deň a potom raz za týždeň do konca pozorovania, keď by mali byť zvieratá odvážené individuálne. Mali by sa zaznamenať fyzické abnormality a poruchy správania samíc alebo potomstva.

*Patológia*

Pitva

Zvieratá P generácie by sa mali makroskopicky vyšetriť v čase utratenia alebo uhynutia počas testu na všetky štruktúrne abnormality alebo patologické zmeny so špeciálnou pozornosťou na reprodukčné orgány. Mŕtve a chradnúce plody by sa mali vyšetriť na defekty.

Histopatológia

Pre mikroskopické vyšetrenie by sa mali fixovať vaječníky, maternica, krček maternice, vagína, semenníky, nadsemenníky, semenné váčky, prostata, koagulačná žľaza, hypofýza, a zasiahnuté orgány všetkých P zvierat. V prípade že tieto orgány neboli vyšetrené v iných testoch s viacerými dávkami, mali by byť mikroskopicky vyšetrené zo všetkých zvierat zo skupiny s najvyššou dávkou a z kontrolnej skupiny a zo zvierat, ktoré uhynuli počas pozorovania.

Orgány vykazujúce abnormality v týchto zvieratách by mali byť potom vyšetrené vo všetkých ostatných P zvieratách. Za týchto okolností by malo byť urobené mikroskopické vyšetrenie všetkých tkanív vykazujúcich výrazné patologické zmeny. Ak sa počas párenia zistila neplodnosť, mali by byť podrobené mikroskopickému vyšetreniu reprodukčné orgány zvierat.

## 2. ÚDAJE

Údaje by mali byť zhrnuté v tabuľke a udávať pre každú testovaciu skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet plodných samcov, počet gravidných samíc, typy zmien a percento zvierat so všetkými typmi zmien.

Ak je to možné, výsledky by mali byť vyhodnotené vhodnou štatistickou metódou. Môže byť použitá hociktorá uznaná štatistická metóda.

## 3. SPRÁVA

### 3.1. Správa z testu

Správa z testu má podľa možnosti obsahovať nasledujúce informácie:

— použitý druh/kmeň,

— údaje o toxickej reakcii pri jednotlivých pohlaviach, dávkach, vrátane plodnosti, gravidity a životaschopnosti,

— časy úmrtí počas pozorovania alebo údaje, či zvieratá prežili do plánovaného času na utratenie, alebo do ukončenia testu,

— tabuľku uvádzajúcu údaje o hmotnosti každého vrhu, priemernú hmotnosť plodov a individuálnu hmotnosť plodov na konci testu,

— toxické alebo iné príznaky na reprodukciu, potomstvo a postnatálny rast,

— čas objavenia každého abnormálneho príznaku a jeho ďalší vývoj,

— údaje o hmotnosti pre P zvieratá,

— nálezy pitvy,

— detailný opis všetkých mikroskopických nálezov,

— štatistické spracovanie výsledkov, kde je to vhodné,

— diskusia o výsledkoch,

— interpretácia výsledkov.

3.2. **Vyhodnotenie a interpretácia**

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

DVOJGENERAČNÝ REPRODUKČNÝ TEST TOXICITY

## 1. METÓDA

### 1.1. Úvod

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.2. Definície

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.3. Referenčné látky

Žiadne.

### 1.4. Princíp testovacej metódy

Testovaná látka je podávaná v odstupňovaných dávkach v niekoľkých skupinách samcov a samíc. Samce parentálnej (P) generácie by mali byť vystavené počas rastu a najmenej jeden úplný cyklus spermatogenézy (približne 56 dní u myší a 70 dní u potkanov) s cieľom vyvolať testovanou látkou nepriaznivé účinky na spermatogenézu.

Samice parentálnej (P) generácie by mali byť vystavené aspoň dva kompletné ovulačné cykly s cieľom vyvolať testovanou látkou nepriaznivé účinky na ovuláciu. Potom sú zvieratá spárené. Testovaná látka sa podáva obom pohlaviam počas periódy párenia a potom len samiciam počas gravidity počas laktácie. Po odstavení pokračuje podávanie testovanej látky v F1 potomstve počas jeho rastu do dospelosti, počas párenia a narodení F2 generácie, pokiaľ nie je F2 generácia odstavená. Pre inhalačné vystavenie je potrebné túto metódu modifikovať.

### 1.5. Kritériá kvality

Žiadne.

### 1.6. Opis testovacej metódy

*Príprava*

Pred testom sú zdravé mladé dospelé zvieratá náhodne rozdelené do skupín na vystavenie a do kontrolných skupín a označené. Parentálne (P) zvieratá sú držané v experimentálnych laboratórnych podmienkach aspoň 5 dní pred testom. Odporúča sa podávať testovanú látku v potrave alebo v pitnej vode. Ostatné spôsoby podávania sú tiež prijateľné. Všetky zvieratá by mali byť vystavené rovnakým spôsobom počas celej doby experimentu. Ak sú nosiče alebo ďalšie pomocné látky použité pri dávkovaní, nemali by mať toxický efekt. Dávkovanie by malo byť sedem dní v týždni.

Pokusné zvieratá: výber druhov

Preferované druhy sú myš a potkan.

Mali by byť použité zdravé P zvieratá, ktoré neboli predmetom žiadnych testov. Nemali by byť použité kmene s nízkou plodnosťou. Zvieratá by mali byť charakterizované podľa druhu, kmeňa, pohlavia, hmotnosti a/alebo veku.

Samce aj samice by mali byť primerane vyšetrené na stanovenie plodnosti. Všetky testované aj kontrolné zvieratá by mali pred začiatkom podávania testovanej látky odstavené od matky.

Počet a pohlavie

Každá vystavená aj kontrolná skupina by mala obsahovať dostatočný počet zvierat, čo znamená asi 20 gravidných samíc v čase vrhu alebo krátko pred ním. Cieľom je získať dosť gravidít a potomstva pre zabezpečenie zmysluplného vyhodnotenia potenciálneho účinku testovanej látky na plodnosť, graviditu a správanie matky v P generácii a na kojené mláďatá, rast a vývin F1 potomstva od počatia po dospelosť a vývin jeho potomstva (F2) do odstavenia od matky.

*Podmienky testu*

Potrava a voda by mali byť poskytnuté ľubovoľne (*ad libidum*). Tesne pred vrhom by mali byť samice separované v pôrodných klietkach alebo v klietkach pre matky s poskytnutým materiálom pre hniezdenie.

Testované dávky

Mali by byť použité aspoň 3 vystavené skupiny a kontrolná skupina. Ak je použitý nosič pri podávaní testovanej látky, kontrolná skupina by mala dostávať nosič v najväčšom použitom objeme. Ak testovaná látka spôsobuje redukciu príjmu potravy alebo jej metabolizmu, je potrebné pouvažovať o použití zodpovedajúcej kontrolnej skupiny. V ideálnom prípade, ak neexistuje nejaké obmedzenie kvôli fyzikálnej/chemickej povahe alebo biologickým vlastnostiam testovanej látky, najvyššia dávka by mala indukovať toxické príznaky, ale nie mortalitu v parentálnej (P) generácii. Stredná dávka alebo dávky by mali indukovať minimálne toxické príznaky spôsobené testovanou látkou a najnižšia dávka by nemala indukovať žiadne pozorovateľné nepriaznivé účinky na rodičov alebo potomkov. Ak sa určená dávky podáva sondou alebo v kapsuliach, dávka by mala byť závislá na individuálnej hmotnosti zvierat a prispôsobovaná každý týždeň zmenám hmotnosti. Pre samice počas gravidity môže dávka závisieť od hmotnosti v nultom alebo šiestom dni gravidity, ak je potrebné.

Limitný test

V prípade látky s nízkou toxicitou, ak dávka aspoň 1 000 mg/kg neindukuje žiadne negatívne vplyvy na reprodukčnú schopnosť, sledovanie ďalších dávok nie je nevyhnutné. Ak predbežné pokusy s najvyššou dávkou a jasnými toxickými príznakmi na matku nevykazujú nepriaznivý účinok na plodnosť, sledovanie ďalších dávok nie je nevyhnutné.

*Vykonanie testu*

Experimentálny plán

Začiatok denného dávkovania samcom parentálnej (P) generácie by mal byť v piatom až deviatom týždni života, keď by mali byť odstavení od matky a aklimatizovaní aspoň päť dní. U potkanov dávkovanie pokračuje 10 týždňov do periódy párenia (pre myši osem týždňov). Samce môžu byť utratené a vyšetrené na konci periódy párenia alebo môžu byť držané na testovanej diéte pre možnosť druhého vrhu a môžu byť utratené a vyšetrené niekedy na konci pozorovania.

Pre parentálne (P) samice sa dávkovanie začína aspoň po piatich dňoch aklimatizácie a pokračuje aspoň dva týždne pred párením. Denné dávkovanie P samíc by malo pokračovať počas trojtýždňovej periódy párenia, gravidity až do odstavenia $F_1$ potomstva. Do úvahy by sa mala brať modifikácia dávkovacieho plánu na základe iných dostupných informácií o testovanej látke, ako je indukcia metabolizmu alebo bioakumulácia.

Dávkovanie $F_1$ zvierat začína po odstavení a končí ich utratením.

Postup pri párení

V reprodukčnom teste toxicity sa môžu použiť pomery párenia 1: 1 (jeden samec a jedna samica) alebo 1: 2 (jeden samec a dve samice).

Pri pomere párenia 1: 1 samica môže byť umiestnená s tým istým samcom, kým sa neprejaví gravidita alebo uplynú tri týždne. Každé ráno by mali byť samice vyšetrené na prítomnosť spermií alebo vaginálnej zátky. Deň 0 gravidity je definovaný ako deň, keď je spozorovaná vaginálna zátka alebo spermie. Ak vezmeme do úvahy spermatogenézu, $F_1$ potomstvo by sa nemalo páriť pokiaľ nedovŕši aspoň 11 týždňov u myši a 13 týždňov u potkana. Pre párenie $F_1$ potomstva sa náhodne vyberie jeden samec a jedna samica z každého vrhu z tej istej ovplyvňovanej skupiny, ktoré sa spária nakríž a vyprodukujú $F_2$ generáciu. $F_1$ samce a samice, ktoré neboli vybraté na kríženia, sa utratia po odstavení od matky.

Pri bezvýslednom párení by mali byť zvieratá vyšetrené na príčinu neplodnosti. To znamená možnosť ďalšieho párenia s inými samcami alebo samicami, prípadne mikroskopické vyšetrenie reprodukčných orgánov a overenie ovulačného cyklu alebo spermatogenézy.

Veľkosť vrhu

Vystavenie zvierat počas testu poskytuje normálnu možnosť vrhu a výchovu potomstva do štádia odstavenia od matky bez štandardizácie vrhov.

Ak je urobená štandardizácia, predpokladajú sa nasledovné postupy. Medzi dňom 1 a 4 po narodení je veľkosť každého vrhu upravená elimináciou plodov navyše a to selekciou štyroch samcov a štyroch samíc na jeden vrh. Ak počet samcov a samíc neumožňuje získať štyri zvieratá z každého pohlavia v jednom vrhu, je prijateľná čiastočná úprava (napríklad päť samcov a tri samice). Úprava je nereálna pre vrhy s menej ako ôsmimi plodmi. Úprava $F_2$ vrhu sa urobí rovnakým spôsobom.

*Pozorovania*

Počas testovacieho obdobia by malo byť každé zviera pozorované denne aspoň raz. Mali by byť zaznamenané nápadné zmeny správania, príznaky ťažkého alebo oneskoreného vrhu a všetky toxické príznaky, vrátane úmrtnosti. V období pred párením a počas párenia by mala byť denne meraná spotreba potravy. Môže byť denne meraná spotreba potravy aj počas gravidity. Po vrhu a počas laktácie by mala byť meraná spotreba potravy (a spotreba vody ak je testovaná látka podávaná v pitnej vode) v ten istý deň ako váženie vrhu. Parentálne zvieratá (P a $F_1$) by mali byť odvážené prvý deň dávkovania a potom raz týždenne. Tieto pozorovania by mali byť zaznamenávané individuálne pre každé dospelé zviera.

Trvanie gravidity sa počíta odo dňa 0 gravidity. Každý vrh by sa mal čo najskôr po pôrode vyšetriť a stanoviť množstvo a pohlavie plodov, potratov (mŕtvych plodov) živých plodov a prítomnosť výrazných anomálií.

Mŕtve plody a plody utratené v 4. deň by sa mali fixovať a vyšetriť na možné defekty. Živé plody by sa mali byť spočítať a vrhy odvážiť ráno hneď po narodení, na 4. a 7. deň a potom raz za týždeň do konca pozorovania, keď by mali byť zvieratá odvážené individuálne. Mali by sa zaznamenať fyzické abnormality a poruchy správania samíc alebo potomstva.

*Patológia*

Pitva

Všetky P a $F_1$ dospelé zvieratá, ak nie sú viac potrebné pre reprodukciu, by sa mali utratiť. $F_1$ potomstvo nevybraté na párenie a celé $F_2$ potomstvo by malo byť utratené po odstavení od matky.

Všetky parentálne zvieratá (P a $F_1$) generácie by sa mali makroskopicky vyšetriť v čase utratenia alebo uhynutia počas testu na všetky štruktúrne abnormality alebo patologické zmeny so špeciálnou pozornosťou na reprodukčné orgány. Mŕtve a chradnúce plody by sa mali vyšetriť na defekty.

Histopatológia

Pre mikroskopické vyšetrenie by mali byť uchované vaječníky, maternica, krček maternice, vagína, semenníky, nadsemenníky, semenné váčky, koagulačná žľaza, prostata, hypofýza, a zasiahnuté orgány všetkých P a $F_1$ zvierat. V prípade, že tieto orgány neboli vyšetrené v iných testoch s viacerými dávkami, mali by byť mikroskopicky vyšetrené zo všetkých zvierat zo skupiny s najvyššou dávkou a z kontrolnej skupiny P a $F_1$ zvierat vybratých na párenie a zo zvierat, ktoré uhynuli počas pozorovania. Orgány vykazujúce abnormality v týchto zvieratách by mali byť potom vyšetrené vo všetkých ovplyvnených skupinách. Za týchto okolností by malo byť urobené mikroskopické vyšetrenie všetkých tkanív vykazujúcich výrazné patologické zmeny. Ak sa počas párenia zistila neplodnosť, mali by byť podrobené mikroskopickému vyšetreniu reprodukčné orgány zvierat.

2. **ÚDAJE**

*Vyhodnotenie výsledkov*

Údaje by mali byť zhrnuté v tabuľke a udávať pre každú testovaciu skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet gravidných zvierat, typy zmien a percento zvierat so všetkými typmi zmien.

Ak je to možné, číselné výsledky by mali byť vyhodnotené vhodnou štatistickou metódou. Môže byť použitá hociktorá uznaná štatistická metóda.

3. **SPRÁVA**

3.1. **Správa z testu**

Správa z testu má podľa možnosti obsahovať nasledujúce informácie:

— použitý druh/kmeň,

— údaje o toxickej reakcii pri jednotlivých pohlaviach, dávkach, vrátane plodnosti, gravidity a známok životaschopnosti,

— časy úmrtí počas pozorovania alebo údaje, či zvieratá prežili do ukončenia testu,

— tabuľku prezentujúcu údaje o hmotnosti každého vrhu, priemernú hmotnosť plodov a individuálnu hmotnosť plodov na konci testu,

— toxické alebo iné príznaky na reprodukciu, potomstvo a postnatálny rast,

— čas objavenia každého abnormálneho príznaku a jeho ďalší vývoj,

— údaje o hmotnosti P a F1 zvierat vybratých do párenia,

— nálezy pitvy,

— detailný opis všetkých mikroskopických nálezov,

— štatistické spracovanie výsledkov, kde je to vhodné,

— diskusiu o výsledkoch,

— interpretáciu výsledkov.

3.2. **Vyhodnotenie a interpretácia**

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

TOXIKOKINETIKA

## 1. METÓDA

### 1.1. Úvod

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.2. Definície

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.3. Referenčné látky

Žiadne.

### 1.4. Princíp testovacej metódy

Testovaná látka je podávaná vhodným spôsobom. V závislosti na účele pozorovania môže byť látka podávaná počas určeného intervalu v jednej alebo v opakovaných dávkach jednej alebo niekoľkým skupinám pokusných zvierat. Neskôr v závislosti od typu testu sa látka a/alebo jej metabolity stanovuje v telových tekutinách, tkanivách a/alebo vo výlučkoch.

Pozorovanie môže prebiehať s neoznačenou alebo označenou formou testovanej látky. Ak sa použije značenie, malo by byť v takej pozícii na testovanej látke, aby poskytlo čo najviac informácií o osude zlúčeniny.

### 1.5. Kritériá kvality

Žiadne.

### 1.6. Opis testovacej metódy

*Príprava*

Zdravé mladé dospelé zvieratá sú aklimatizované v laboratórnych podmienkach aspoň 5 dní pred testom. Pred testom sú zvieratá náhodne rozdelené do skupín na ovplyvnenie a kontrolných skupín a označené. Za výnimočných okolností môžu byť použité veľmi mladé, gravidné alebo vopred vystavené zvieratá.

*Podmienky testu*

Pokusné zvieratá

Toxikokinetické testy sa môžu vykonávať na jednom alebo viacerých vhodných druhoch zvierat a mali by brať do úvahy, či sa tieto druhy použijú, alebo zamýšľajú použiť aj v iných toxikologických testoch s tou istou testovanou látkou. Ak sú v teste použité hlodavce, odchýlka ich hmotnosti by nemala presahovať ± 20 % priemernej hmotnosti.

Počet a pohlavie

Pre testy absorbcie a exkrécie by sa mali použiť štyri zvieratá v každej skupine s rôznou dávkou. Nie je nevyhnutné preferovať niektoré pohlavie, ale za určitých okolností sa môžu otestovať obe pohlavia. Ak je reakcia pohlaví odlišná, potom by sa mali testovať štyri zvieratá z každého pohlavia. V prípade použitia nehlodavcov je možné použiť menší počet zvierat.

Ak sa testuje distribúcia látky v tkanivách, veľkosť počiatočnej skupiny by mala brať do úvahy počet zvierat, ktoré sa utratia v každom plánovanom časovom intervale a počet plánovaných testovaných intervalov.

Ak je testovaný metabolizmus, veľkosť skupiny závisí na potrebách testu.

Pre testy s väčším počtom dávok a viacerými plánovanými časovými intervalmi by sa pri stanovení veľkosti skupiny mal brať do úvahy počet plánovaných intervalov a počet plánovaných utratení. Pri každom vyšetrení by počet zvierat nemal byť nikdy menší ako dve. Veľkosť skupiny by mala byť dostatočná pre poskytnutie prijateľnej informácie o absorbcii, hornej hranici (plateau) a vyčerpaní (ak je potrebné) testovanej látky a/alebo jej metabolitov.

Testované dávky

V prípade jednorazového podania by mali byť použité aspoň dve rôzne dávky. Nižšia dávka, pri ktorej by nemal byť pozorovaný žiadny toxický účinok a vyššia dávk, pri ktorej by mohli nastať zmeny v toxikokinetických parametroch, alebo pri ktorých sa objaví toxický účinok.

V prípade viacnásobného podávania je bežne postačujúca nižšia dávka, ale za určitých okolností je potrebná aj vyššia dávka.

Spôsob podávania

Pri toxikokinetických testoch by sa mal používať rovnaký spôsob podávania a ak je plánovaný nosič, mal by byť použitý aj v ostatných testoch toxicity. Testovaná látka sa v ovplyvňovanej skupine zvierat bežne podáva orálnou sondou alebo v potrave, aplikovaná na kožu alebo inhaláciou počas stanoveného času. Vnútrožilové (intravenózne) podávanie testovanej látky by sa mohlo použiť pri stanovení relatívnej absorbcie v porovnaní s ostatnými spôsobmi podávania. Navyše môže poskytnúť užitočné informácie pre model distribúcie danej látky skoro po jej aplikácii.

Mala by sa brať do úvahy možnosť interferencie nosiča s testovanou látkou. Pozornosť by sa mala venovať rozdielom v absorbcii látky medzi rôznymi spôsobmi podávania ako je sonda a potrava, preto je nevyhnutné presne stanoviť dávku, obzvlášť ak je testovaná látka podávaná v potrave.

Doba pozorovania

Všetky zvieratá by sa mali byť denne sledovať a zaznamenávať príznaky toxicity a ostatné dôležité klinické príznaky, vrátane času nástupu, stupňa a trvania.

*Postup*

Po odvážení testovaných zvierat sa testovaná látka podáva vhodným spôsobom. Ak je to dôležité, zvieratá môžu dostávať testovanú látku nalačno.

Absorbcia

Rýchlosť a rozsah absorbcie testovanej látky môže byť hodnotený rôznymi metódami bez použitia alebo s použitím referenčnej skupiny ([1]), napríklad:

— stanovenie množstva testovanej látky a/alebo jej metabolitov vo výlučkoch ako je moč, žlč, výkaly, vydychovaný vzduch a zvyšky v tele zvieraťa po smrti,

— porovnanie biologickej odpovede (napr. akútne toxikologické testy) medzi testovanými, kontrolnými a/alebo referenčnými skupinami,

— porovnanie množstva testovanej látky a/alebo jej metabolitov vylúčených obličkami v testovaných a referenčných skupinách,

— stanovenie plochy pod krivkou závislosti hladiny plazmy od času pre testovanú látku a/alebo jej metabolity a porovnania údajov s referenčnou skupinou.

([1]) V tejto metóde je referenčná skupina tá, v ktorej je testovaná látka podávaná iným spôsobom pre úplné začlenenie danej dávky do biologického systému.

Distribúcia

Pre analýzu modelov distribúcie sú v súčasnosti možné dva prístupy, môže byť použitý jeden z nich alebo obidva:

— dôležité kvalitatívne informácie sa získajú autorádiografickými technikami celého tela,

— kvantitatívne informácie sa získajú po utratení zvierat v rôznych časových intervaloch po ovplyvnení a stanovení koncentrácie a množstva testovanej látky a/alebo jej metabolitov v tkanivách a orgánoch.

Vylučovanie

V testoch vylučovania sa zbiera moč, výkaly, vydychovaný vzduch a za určitých okolností aj žlč. V týchto výlučkoch je niekoľkokrát po ovplyvnení merané množstvo testovanej látky a/alebo jej metabolitov, pokiaľ nie je vylúčené okolo 95 % podanej dávky (najdlhšie sedem dní).

V špeciálnych prípadoch pri testovaní zvierat v laktácii je potrebné brať do úvahy vylučovanie testovanej látky do mlieka.

Metabolizmus

Pre stanovenie rozsahu a modelu metabolizmu by sa mali biologické vzorky analyzovať vhodnými metódami. Ak sú nejasnosti z predchádzajúcich toxikologických testov, mala by sa objasniť štruktúra metabolitov a navrhnúť vhodná metabolická dráha. Pre získanie informácií o metabolickej dráhe môže byť užitočné testovanie *in vitro*.

Ďalšie informácie o vzťahoch metabolizmu a toxicity môžu byť získané z biochemických testov, ako je stanovenie účinkov na metabolizujúce enzymatické systémy, vyčerpanie endogénnych neproteínových sulfhydrylových zlúčenín a väzba testovanej látky na makromolekuly.

## 2. ÚDAJE

Vzhľadom k typu prevedeného testu by mali byť údaje zhrnuté v tabuľke doplnené grafmi, keď je to vhodné. Pre každú testovanú skupinu, ak je to vhodné, by mala byť určená priemerná hodnota a smerodajná odchýlka v závislosti od času, dávky, tkaniva a orgánu. Ak sa robili metabolické testy, mala by byť určená štruktúra identifikovaných metabolitov a stanovené pravdepodobné metabolické dráhy.

## 3. SPRÁVA

### 3.1. Správa z testu

Vzhľadom k typu prevedeného testu, správa z testu obsahuje podľa možnosti tieto informácie:

— druh, kmeň, pôvod, podmienky prostredia, výživa,

— ak je použitá označená látka – jej vlastnosti,

— veľkosti dávok a použité časové intervaly,

— spôsoby podávania a každý použitý nosič,

— zistené toxické a iné príznaky,

— metódy stanovenia testovanej látky a/alebo jej metabolitov v biologických vzorkách, vrátane vydychovaného vzduchu,

— tabuľky meraní podľa pohlavia, dávky, životosprávy, času, tkanív a orgánov,

— stanovenie rozsahu absorbcie a vylučovania (exkrécie) v závislosti od času,
— metódy na charakterizovanie a identifikáciu metabolitov v biologických vzorkách,
— metódy biochemických meraní vo vzťahu k metabolizmu,
— navrhnuté metabolické dráhy,
— diskusiu o výsledkoch,
— interpretáciu výsledkov.

3.2. **Vyhodnotenie a interpretácia**

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

TESTOVANE MUTAGENITY A KARCINOGENITY

GÉNOVÁ MUTÁCIA – *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

## 1. METÓDA

### 1.1. Úvod

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.2. Definície

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.3. Referenčné látky

Žiadne.

### 1.4. Princíp testovacej metódy

Na zisťovanie vzniku génových mutácií indukovaných chemickými agensami sa používa množstvo haploidných a diploidných kmeňov kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* buď s metabolickou aktiváciou, alebo bez nej.

Môže byť použitý systém priamych mutácií v haploidných kmeňoch (*ade-1 alebo ade-2*), ktoré sú červené a ďalšou mutáciou sa menia na dvojité biele mutanty alebo selektívny systém, ako je indukcia rezistencie na kanavanín a cykloheximid.

Prevažne sa však požíva overený systém reverzných mutácií s haploidným kmeňom XV 185 – 14C, ktorý nesie *„ochre nonsens“* mutácie *ade 2-1, arg 4-17, lys 1-1 a trp 5-48*. Tieto mutácie sú reverzibilné bázovou substitúciou použitím mutagénov, ktoré indukujú *„site“* špecifické mutácie alebo *„ochre“* supresorové mutácie. XV 185- 14C nesie tiež *his 1-7* marker. Je to *„missens“* mutácia, ktorá je väčšinou reverzibilná druhou *„site“* mutáciou. Takisto nesie ďalší marker *hom 3-10*, ktorý je reverzibilný „frameshift“ mutagénmi.

Z diploidných kmeňov *S. cerevisiae* je prevažne používaný kmeň D7, ktorý je homozygotný v *ilv 1-92*.

### 1.5. Kritériá kvality

Žiadne.

### 1.6. Opis testovacej metódy

*Príprava*

Roztoky testovaných chemikálií a kontroly by mali byť pripravované tesne pred testovaním s použitím vhodných rozpúšťadiel. V prípade organických zlúčenín, ktoré nie sú rozpustné vo vode, malo by byť použité organické rozpúšťadlo ako etanol, acetón alebo dimetylsulfoxid (DMSO) nie viac ako 2 % roztok v/v. Výsledná koncentrácia rozpúšťadla by nemala výrazne ovplyvňovať životaschopnosť buniek a rastové parametre.

Metabolická aktivácia

Bunky by mali byť ovplyvnené testovanou látkou bez prítomnosti a s prítomnosťou vhodného exogénneho metabolického aktivačného systému.

Najbežnejšie používaný systém je post-mitochondriálna frakcia z pečene hlodavcov doplnená kofaktormi vopred ovplyvnená latkami indukujúcimi enzýmy. Na metabolickú aktiváciu môže byť vhodné použitie aj iných druhov, tkanív, post-mitochondriálnych frakcií alebo iných postupov.

*Podmienky testovania*

Testovacie kmene

Pre testy génových mutácií sú najpoužívanejšími haploidný kmeň XV 185-14C a diploidný kmeň D7. Vhodné môžu byť aj iné kmene.

Médiá

Pre stanovenie prežívania a počtu mutantov sa používajú vhodné kultivačné médiá.

Použitie negatívnych a pozitívnych kontrol

Súbežne by sa mali použiť pozitívne kontroly, neovplyvnené kontroly a kontroly s rozpúšťadlom. Pre každý špecifický typ mutácií by sa mala použiť vhodná chemikália ako pozitívna kontrola.

Koncentrácie vystavenia

Malo by sa použiť aspoň päť primerane odstupňovaných koncentrácií testovanej látky. Pri toxických látkach by nemala najvyššia testovaná koncentrácia znižovať prežívanie pod 5 až 10 %. Látky relatívne nerozpustné vo vode by mali byť testované až do hranice ich rozpustnosti použitím vhodných metód. Pri netoxických látkach voľne rozpustných vo vode by sa mala najvyššia použitá koncentrácia stanoviť z prípadu na prípad.

Inkubačné podmienky

Platne sú inkubované štyri až sedem dní pri 28 a 30 °C v tme.

Frekvencia spontánnych mutácií

Mali by byť použité monokultúry s frekvenciou spontánnych mutácií v prijateľnom rozsahu.

Počet opakovaní

Pri testovaní vzniku prototrofov génovou mutáciou a pre stanovenie prežívania buniek by mali byť použité najmenej tri opakovania pre každú koncentráciu. V prípade experimentov používajúcich markery ako *hom 3-10* s nízkou mutačnou frekvenciou sa množstvo použitých platní má zvýšiť tak, aby poskytovalo štatisticky významné údaje.

*Postupy*

Ovplyvňovanie *S. cerevisiae* sa bežne robí v tekutom prostredí použitím stacionárnych alebo rastúcich buniek. Začiatočné experimenty by sa mali robiť na rastúcich bunkách: bunky s koncentráciou 1 - 5 x $10^7$/ml sú ovplyvnené testovanou chemikáliou maximálne 18 hodín pri 28 až 37 °C pri neustálom prevzdušňovaní; ak je potrebné, pridá sa počas experimentu primerané množstvo metabolického aktivátora. Na konci ovplyvnenia sú bunky zcentrifugované, premyté a vysiate na vhodné kultivačné médium. Po inkubácii sú platne vyhodnotené na prežívanie a indukciu génových mutácií.

Ak je prvý experiment negatívny, v druhom experimente by sa mali použiť bunky stacionárnej fázy. Ak je prvý experiment pozitívny, malo by sa to potvrdiť vo vhodnom nezávislom experimente.

2. **ÚDAJE**

Údaje by mali byť prezentované v tabuľke a udávať počet kolónií, počet mutantov, prežívania a frekvenciu mutantov. Všetky výsledky by mali byť potvrdené v nezávislom experimente. Výsledky by mali byť vyhodnotené vhodnou štatistickou metódou.

3. **SPRÁVA**

3.1. **Správa z testu**

Správa z testu má podľa možnosti obsahovať tieto informácie:

— použité kmene,

— podmienky pri teste: rastúce bunky alebo bunky stacionárnej fázy, zloženie médií, trvanie inkubácie a inkubačná teplota, metabolický aktivačný systém,

— podmienky vystavenia: použité koncentrácie, metódy a doba vystaveniaa, teplota pri vystavení, pozitívne a negatívne kontroly,

— spočítaný počet kolónií, počet mutantov, prežívanie a frekvencia mutantov, vzťah dávka/odpoveď ak je to reálne, štatistické vyhodnotenie údajov,

— diskusiu o výsledkoch,

— interpretáciu výsledkov.

3.2. **Vyhodnotenie a interpretácia**

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

MITOTICKÁ REKOMBINÁCIA – *SACCHAROMYCESC CEREVISIAE*

## 1. METÓDA

### 1.1. Úvod

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.2. Definície

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.3. Referenčné látky

Žiadne.

### 1.4. Princíp testovacej metódy

Mitotická rekombinácia v *Saccharomyces cerevisiae* môže byť detekovaná medzi génmi (alebo všeobecnejšie medzi génom a jeho centromérou) a vo vnútri génov. Prvý dej sa nazýva mitotický crossing-over a vytvára recipročné produkty, zatiaľ čo druhý dej je najčastejšie nerecipročný a nazýva sa génová konverzia. V crossing-overe je všeobecne hodnotené množstvo recesívne homozygotných kolónií alebo sektorov vzniknutých v heterozygotnom kmeni, zatiaľ čo v génovej konverzii je hodnotené množstvo prototrofných revertantov vzniknutých v auxotrofnom heteroalelickom kmeni, ktorý nesie dve rozdielne defektné alely v tom istom géne. Najbežnejšie používané kmeňe pre detekciu mitotickej génovej konverzie sú $D_4$ (heteroalelický v *ade 2* a *trp 5*), $D_7$ (heteroalelický v *trp 5*), $BZ_{34}$ (heteroalelický v arg 4) a JD1 (heteroalelický v *his 4* a *trp 5*). Mitotický crossing-over vytvárajúci červené a ružové homozygotné sektory môže byť testovaný v $D_3$ alebo v $D_{7.}$ (v ktorom môžeme takisto detekovať mitotickú génovú konverziu a reverzné mutácie v *ilv 1-92*), oba kmene sú heteroalelické pre komplementáciu alel *ade 2*.

### 1.5. Kritériá kvality

Žiadne.

### 1.6. Opis testovacej metódy

*Príprava*

Roztoky testovaných chemikálií a kontroly alebo referenčné zlúčeniny by mali byť pripravované tesne pred testovaním s použitím vhodných rozpúšťadiel. V prípade organických zlúčenín, ktoré nie sú rozpustné vo vode, by sa malo použiť organické rozpúšťadlo ako etanol, acetón alebo dimetylsulfoxid (DMSO) nie viac ako 2 % roztok v/v. Výsledná koncentrácia rozpúšťadla by nemala výrazne ovplyvňovať životaschopnosť buniek a rastové parametre.

Metabolická aktivácia

Bunky by mali byť ovplyvnené testovanou látkou bez prítomnosti a s prítomnosťou vhodného exogénneho metabolického aktivačného systému. Najbežnejšie používaný systém je post-mitochondriálna frakcia z pečene hlodavcov doplnená kofaktormi vopred ovplyvnená latkami indukujúcimi enzýmy. Na metabolickú aktiváciu môže byť vhodné použitie aj iných druhov, tkanív, post-mitochondriálnych frakcií alebo iných postupov.

*Testovacie podmienky*

Testovacie kmene

Najviac používanými kmeňmi sú diploidy $D_4$, $D_5$, $D_7$ a JD1. Môžu sa použiť aj iné kmene.

Médiá

Na stanovenie prežívania a frekvencie mitotickej rekombinácie sa používajú vhodné kultivačné médiá.

Použitie negatívnych a pozitívnych kontrol

Súbežne by mali byť použité pozitívne, neovplyvnené kontroly a kontroly s rozpúšťadlom. Pre každý špecifický typ mutácií by sa mala použiť vhodná chemikália ako pozitívna kontrola.

Koncentrácie vystavenia

Malo by sa použiť aspoň päť primerane odstupňovaných koncentrácií testovanej látky. Medzi faktormi, ktoré treba brať do úvahy, je cytotoxicita a rozpustnosť. Najnižšia koncentrácia nemá mať efekt na životaschopnosť buniek. Pri toxických chemikáliách by nemala najvyššia testovaná koncentrácia znižovať prežívanie pod 5 až 10 %. Látky relatívne nerozpustné vo vode by mali byť testované až do hranice ich rozpustnosti použitím vhodných metód. Pri netoxických látkach voľne rozpustných vo vode by sa mala najvyššia použitá koncentrácia stanoviť z prípadu na prípad.

Bunky môžu byť vystavené testovanej chemikálii buď v stacionárnej fáze, alebo v rastovej fáze maximálne 18 hodín. Pri dlhšom vystavení by sa malo v kultúrach sledovať formovanie spór, prítomnosť ktorých znehodnocuje test.

Inkubačné podmienky

Platne sú inkubované štyri až sedem dní pri 28 – 30 °C v tme. Platne použité pre testovanie červených a ružových homozygotných sektorov vzniknutých mitotickým crossing-overom by mali byť po skončení experimentu držané v chladničke (okolo 4 °C) ďalšie jeden až dva dni pred vyhodnotením, čo umožní vytvorenie hodnotiteľných pigmentovaných kolónií.

Frekvencia spontánnej mitotickej rekombinácie

Mali by byť použité monokultúry s frekvenciou spontánnej mitotickej rekombinácie v prijateľnom rozsahu.

Počet opakovaní

Pri testovaní vzniku prototrofov mitotickou génovou konverziou a pre stanovenie prežívania buniek by mali byť použité najmenej tri opakovania pre každú koncentráciu. V prípade testovania recesívnych homozygotov vzniknutých mitotickým crossing-overom sa množstvo použitých platní má zvýšiť tak, aby poskytovalo primerané množstvo kolónií.

*Postupy*

Ovplyvňovanie *S. cerevisiae* sa bežne robí v tekutom prostredí použitím stacionárnych alebo rastúcich buniek. Začiatočné experimenty by sa mali robiť na rastúcich bunkách: bunky s koncentráciou 1 - 5 x $10^7$/ml sú vystavené testovanej chemikálii maximálne 18 hodín pri 28 až 37 °C pri neustálom prevzdušňovaní; ak je potrebné, pridá sa počas experimentu primerané množstvo metabolického aktivátora.

Na konci ovplyvnenia sú bunky zcentrifugované, premyté a vysiate na vhodné kultivačné médium. Po inkubácii sú platne vyhodnotené na prežívanie a indukciu mitotickej rekombinácie.

Ak je prvý experiment negatívny, v druhom experimente by sa mali použiť bunky stacionárnej fázy. Ak je prvý experiment pozitívny, malo by sa to potvrdiť vo vhodnom nezávislom experimente.

2. **ÚDAJE**

Údaje by mali byť prezentované v tabuľke a udávať počet kolónií, počet rekombinantov, prežívanie a frekvenciu rekombinantov.

Výsledky by mali byť potvrdené v nezávislom experimente.

Údaje by mali byť vyhodnotené vhodnou štatistickou metódou.

3. **SPRÁVA**

3.1. **Správa z testu**

Správa z testu má podľa možnosti obsahovať tieto informácie:

— použité kmene,

— podmienky pri teste: bunky stacionárnej fázy alebo rastúce bunky, zloženie médií, inkubačná teplota a trvanie inkubácie, metabolický aktivačný systém,

— podmienky ovplyvňovania: použité koncentrácie, metódy a trvanie ovplyvnenia, teplota pri ovplyvnení, pozitívne a negatívne kontroly,

— spočítaný počet kolónií, počet rekombinantov, prežívanie a frekvencia rekombinantov, vzťah dávka/odpoveď ak je to reálne, štatistické vyhodnotenie údajov,

— diskusiu o výsledkoch,

— interpretáciu výsledkov.

3.2. **Vyhodnotenie a interpretácia**

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

TEST GÉNOVÝCH MUTÁCIÍ BUNIEK CICAVCOV *IN VITRO*

## 1. METÓDA

### 1.1. Úvod

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.2. Definícia

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.3. Referenčné látky

Žiadne.

### 1.4. Princíp testovacej metódy

Systémy kultúr cicavčích buniek sa môžu použiť na zistenie mutácií, ktoré sú indukované chemickými látkami. Medzi často používané bunkové línie patria L5178Y lymfatické bunky myší, CHO a V-79 línie buniek čínskeho škrečka. Najčastejšie používané systémy v týchto bunkových líniach zisťujú mutácie v lokusoch: tymidín kinázy (TK), hypoxantín guanín fosforibozyl transferázy (HPRT) ([1]) a $Na^+/K^+$ ATP-ázy. Mutačné systémy TK a HPRT zisťujú mutácie bázových párov, posunové mutácie a malé delécie; systém $Na^+/K^+$ určuje iba mutácie bázových párov.

Bunky deficitné v tymidín kináze (TK) sú vďaka priamej mutácii $TK^+ - TK^-$ rezistentné na brómdeoxyuridín (BrdU), fluórdeoxyuridín (FdU) alebo trifluórtymidín (TFT), nakoľko tieto antimetabolity nie sú začlenené do bunkových nukleotidov prostredníctvom systému„záchranného“ enzýmu tymidín kinázy; nukletotidy potrebné pre bunkový metabolizmus sa získavajú jedine pomocou de novo syntézy. V prítomnosti tymidín kinázy sa však BrdU, FdU alebo TFT začleňujú do nukleotidov, čo má za následok inhibíciu bunkového metabolizmu a cytotoxicitu. Preto sú mutantné bunky schopné proliferovať v prítomnosti BrdU, FdU alebo TFT, zatiaľ čo normálne bunky, obsahujúce tymidín kinázu, nie. Podobne aj bunky deficitné v HPRT sa selektujú na základe rezistencie na 8-azaguanín (AG) alebo 6-tioguanín (TG). Bunky s pozmenenou $Na^+/K^+$ ATP-ázou sa selektujú na základe rezistencie na ouabaín.

Cytotoxicita sa určuje meraním vplyvu testovaného materiálu na schopnosť tvoriť kolónie (klonovacia efektivita) alebo rýchlosti rastu kultúr. Mutačná frekvencia sa určí vysievaním známeho počtu buniek v prostredí obsahujúcom selektívny agens s cieľom určiť zmutované bunky a v prostredí neobsahujúcom selektívny agens s cieľom určiť prežívajúce bunky. Po vhodnej inkubačnej dobe sa kolónie spočítajú. Mutačné frekvencie sa vypočítajú z počtu zmutovaných kolónií upraveného na bunkové prežívanie.

### 1.5. Kritériá kvality

Žiadne.

### 1.6. Opis testovacej metódy

*Príprava*

Bunky

V tomto teste sa používajú rozmanité bunkové línie. Tieto línie zahŕňajú subklony L5178Y, CHO bunky alebo V-79 bunky s preukázanou citlivosťou na chemické mutagény, s vysokou efektivitou klonovania a nízkou frekvenciou spontánnej mutability. Bunky by sa mali periodicky kontrolovať vzhľadom na stabilitu karyotypu a kontrolujú sa aj na kontamináciu mykoplazmou. Iné typy buniek sa môžu použiť za predpoladu, že je úplne doložené ich uplatnenie ako skúšobného testu chemicky indukovaných génových mutácií.

([1]) Predtým HGPRT.

Médium

Používajú sa vhodné kultivačné médiá a inkubačné podmienky (napr. teplota, použité kultivačné nádoby, koncentrácia $CO_2$ a vlhkosť). Médiá a séra sa vyberajú s ohľadom na selektívne systémy a typ buniek použitý počas testu.

Testovaná látka

Testované látky sa môžu pripraviť v kultivačnom médiu alebo rozpustené, alebo rozsuspendované vo vhodnom nosiči pred vystavením buniek. Finálna koncentrácia nosiča v kultivačnom systéme by nemala ovplyvniť životaschopnosť buniek alebo rýchlosť rastu.

Metabolická aktivácia

Bunky by mali byť vystavené testovanej látke tak v prítomnosti ako i neprítomnosti vhodného exogénneho metabolického cicavčieho aktivačného systému. V alternatívnych prípadoch, v ktorých sa používajú typy buniek s endogénnou metabolickou aktivitou, musí byť známa rýchlosť a povaha tejto aktivity, aby zodpovedala testovanej triede chemikálií.

*Testovacie podmienky*

Použitie negatívnych a pozitívnych kontrol

Pozitívne kontroly využívajúce priamo pôsobiace zlúčeniny a zlúčeniny vyžadujúce metabolickú aktiváciu by sa mali zahrnúť do každého experimentu; negatívna kontrola (nosič) by sa mala tiež použiť.

Tieto látky sú príkladmi látok, ktoré môžu byť použité ako pozitívne kontroly:

— priamo pôsobiace zlúčeniny:

  — etylmetánsulfonát,

  — hykantón,

— nepriamo pôsobiace zlúčeniny:

  — 2-acetylaminofluorén,

  — 7,12-dimetylbenzántracén,

  — N-nitrózodimetylamín.

Ak je potrebné, môže byť zahrnutá dodatočná pozitívna kontrola rovnakej chemickej triedy ako testovaná chemikália.

Koncentrácie vystavenia

Použiť by sa mali viaceré koncentrácie testovanej látky. Tieto koncentrácie majú poskytnúť toxický účinok spôsobený koncentráciou, pričom najvyššia koncentrácia vedúca k nízkej úrovni prežívania a prežívanie v najnižšej koncentrácii je približne rovnaké ako v negatívnej kontrole.

Vo vode ťažko rozpustné látky sa musia testovať až do hranice rozpustnosti s využitím vhodných postupov. V prípade vo vode ľahko rozpustných netoxických látok sa horná hranica koncentrácie testovanej látky musí určiť od prípadu k prípadu.

*Postup*

Počet buniek použitých pre jednu kultúru sa má vzťahovať na frekvenciu spontánnych mutácií; všeobecné vodítko je vziať počet životaschopných buniek, ktoré je 10 - násobkom prevrátenej hodnoty frekvencie spontánnych mutácií.

Bunky by sa mali vystaviť počas vhodného obdobia, vo väčšine prípadov je účinný interval od dvoch do piatich hodín. Bunky bez dostatočnej endogénnej metabolickej aktivity by sa mali vystaviť testovanej látke tak v prítomnosti ako i neprítomnosti vhodného metabolického aktivačného systému. Na konci obdobia vystavenia sa bunky premyjú a zbavia testovanej látky a kultivujú sa s cieľom určenia životaschopnosti a umožnenia prejavenia sa mutantného fenotypu.

Na konci obdobia expresie, ktoré musí byť dostačujúce na to, aby umožnilo takmer optimálnu fenotypovú expresiu indukovaných mutantov, sa bunky nechajú vyrásť na živnej pôde za prítomnosti ako aj v neprítomnosti selektívnych agensov s cieľom určenia počtu mutantov a životaschopnosti.

Všetky výsledky sú potvrdené nezávislým experimentom.

2. **ÚDAJE**

Dáta sa prezentujú vo forme tabuliek. Pre indukciu mutácií ako aj pre prežívanie by sa mali uvádzať jednotlivé počty na miskách pre testovanú látku a pre kontrolu. Taktiež sa má uviesť priemerný počet kolónií na jednu misku a štandardná odchýlka. Mutačná frekvencia sa má vyjadriť ako počet mutantov vzhľadom na počet prežívajúcich buniek. Efektivity prežívania a klonovania sa vyjadrujú v percentách úrovne kontroly.

Dáta sa vyhodnocujú použitím vhodných štatistických metód.

3. **SPRÁVA**

3.1. **Správa z testu**

V prípade, že je to možné, správa o teste obsahuje tieto informácie:

— použitá bunková línia, počet bunkových kultúr, metódy na udržiavanie bunkových kultúr,

— testovacie podmienky, zloženie živného média, koncentrácia $CO_2$, koncentrácia testovanej látky, použitý nosič, inkubačná teplota, inkubačný čas, dĺžka intervalu expresie (vrátane počtu vysiatych buniek a podkultúr a harmonogramov výživy, ak je to možné), dobu vystavenia, hustotu buniek počas vystavenia, typ použitého cicavčieho metabolického aktivačného systému, pozitívne a negatívne kontroly, použitý selektívny agens,

— odôvodnenie výberu dávok,

— použité metódy na výpočet počtu životaschopných a mutantných buniek,

— štatistické vyhodnotenie,

— diskusia o výsledkoch,

— interpretácia výsledkov.

3.2. **Vyhodnotenie a interpretácia**

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

POŠKODENIE A OPRAVA DNA– NEPROGRAMOVANÁ SYNTÉZA DNA – BUNKY CICAVCOV *IN VITRO*

1. **METÓDA**

1.1. **Úvod**

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. **Definícia**

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.3. **Referenčné látky**

Žiadne.

1.4. **Princíp testovacej metódy**

Test neprogramovanej syntézy DNA (UDS) meria reparačnú syntézu DNA po vyštiepení a odstránení úseku DNA, ktorý obsahuje oblasť poškodenia vyvolaného chemickými a fyzikálnymi agensmi. Test je založený na inkorporácii tymidínu značeného tríciom ($^3$H-TdR) do DNA buniek cicavcov, ktoré sa nenachádzajú v S fáze bunkového cyklu. Príjem $^3$H-TdR sa môže determinovať autorádiografiou alebo meraním DNA z ovplyvnených buniek v scintilačnej kvapaline (LSC). Cicavčie bunky v kultúre, pokiaľ sa nepoužívajú primárne hepatocyty potkanov, sa ovplyvňujú testovaným agensom v prítomnosti ako aj neprítomnosti exogénneho metabolického aktivačného systému. UDS sa tiež môže merať v *in vivo* systémoch.

1.5. **Kritériá kvality**

Žiadne.

1.6. **Opis testovacej metódy**

*Príprava*

Testované chemikálie a kontrolné alebo odporúčané látky by sa mali pripraviť v rastovom médiu alebo rozpustiť, alebo rozsuspendovať vo vhodnom nosiči, a potom ďalej rozriediť v rastovom médiu na použitie v skúšobnom teste. Konečná koncentrácia nosiča by nemala ovplyvňovať životaschopnosť buniek.

V skúšobnom teste sa môžu použiť primárne kultúry potkaních hepatocytov, ľudských lymfocytov alebo stabilných bunkových línií (napr. ľudských diploidných fibroblastov).

Bunky sa vystavujú pôsobeniu testovanej chemikálie tak v prítomnosti ako aj v neprítomnosti vhodného metabolického aktivačného systému.

*Testovacie podmienky*

Počet kultúr

Pre každý krok experimentu sa používajú minimálne dve bunkové línie na autorádiografiu a šesť kultúr (alebo menej, ak je to vedecky overené) na stanovenie UDS pomocou LSC.

Použitie negatívnej a pozitívnej kontroly

Ku každému experimentu sa pripájajú súbežné pozitívne a negatívne (neovplyvnené vzorky a/alebo vzorka s nosičom) kontroly s alebo bez metabolickej aktivácie.

Príklady pozitívnych kontrol pre test potkaních hepatocytov zahŕňajú 7,12-dimetylbenzantracén (7,12-DMBA) alebo 2-acetylaminofluorén (2-AAF). V prípade stabilných bunkových línií je príkladom pozitívnej kontroly 4-nitrochinolín-N-oxid (4-NQO) ako pre autorádiografický, tak aj pre LSC test vykonaný bez metabolickej aktivácie; N-dimetylnitrózamín je príkladom pozitívnej kontrolnej zlúčeniny, ak sa používa metabolický aktivačný systém.

Koncentrácie vystavenia

Používajú sa mnohonásobné koncentrácie testovanej látky v rozsahu primeranom na definovanie odpovede. Najvyššia koncentrácia by mala vyvolať určité cytotoxické účinky. Vo vode ťažko rozpustné zlúčeniny by sa mali testovať až do hranice rozpustnosti. V prípade vo ľahko vode rozpustných netoxických chemikálií sa horná koncentrácia testovanej chemikálie určuje od prípadu k prípadu.

Bunky

Na udržiavanie kultúr musia byť použité vhodné rastové médiá, koncentrácia $CO_2$, teplota a vlhkosť. Stabilné bunkové línie sa periodicky kontrolujú na kontamináciu mykoplazmou.

Metabolická aktivácia

Metabolický aktivačný systém sa nepoužíva v kultúrach primárnych hepatocytov. Stabilné bunkové línie a lymfocyty sa vystavia testovanej látke tak v prítomnosti ako aj v neprítomnosti vhodného metabolického aktivačného systému.

*Postup*

Príprava kultúr

Stabilné bunkové línie sa získajú zo zásobnej kultúry (napr. trypsinizáciou alebo pretrepávaním), naočkujú do kultivačných nádob v primeranej hustote a inkubujú pri 37 °C.

Krátkodobé kultúry potkaních hepatocytov sa získajú tak, že čerstvo disociovaným hepatocytom sa umožní vo vhodnom médiu pripevniť sa na rastový povrch.

Kultúry ľudských lymfocytov sa zakladajú s použitím primeranej techniky.

Vystavenie kultúr testovanej látke

Primárne potkanie hepatocyty

Čerstvo izolované hepatocyty potkanov sa vystavia testovanej látke v médiu obsahujúcom $^3$H-TdR počas primeraného časového intervalu. Na konci obdobia vystavenia sa bunky zbavia média, potom premyjú, fixujú a vysušia. Sklíčka sa ponoria do autorádiografickej emulzie (prípadne sa môže použiť „stripping“ film), exponujú, vyvolajú, farbia a spočítajú.

Stabilné bunkové línie a lymfocyty

*Autorádiografické techniky*: Bunkové kultúry sa ovplyvňujú testovanou látkou na primeraný čas, po ktorom nasleduje ovplyvnenie s $^3$H-TdR. Časy ovplyvnenia sa určia povahou látky, aktivitou metabolických systémov a typom buniek. Na určenie vrcholu UDS sa pridáva $^3$H-TdR buď súčasne s testovanou látkou, alebo počas niekoľkých minút po vystavení testovanej látke. Výber medzi týmito dvoma postupmi bude ovplyvnený možnými interakciami medzi testovanou látkou a $^3$H-TdR. Na odlíšenie UDS od semikonzervatívnej replikácie DNA sa môže táto inhibovať, napríklad použitím arginín-deficitného média, nízkeho obsahu séra alebo pomocou hydroxyurei v kultivačnom médiu.

*LSC meranie UDS*: Pred ovplyvnením testovanou látkou sa vyššie opísaným spôsobom blokuje vstup buniek do S fázy; bunky sa potom vystavia testovanej chemikálii spôsobom opísaným pri autorádiografii. Na konci inkubačnej doby sa z buniek izoluje DNA a stanoví sa celkový obsah DNA a množstvo inkorporovaného $^3$H-TdR.

Je potrebné pripomenúť, že pri použití ľudských lymfocytov vo vyššie opísanej technike sa nevyžaduje potlačenie semikonzervatívnej replikácie DNA v nestimulovaných bunkách.

*Analýza*

Autorádiografické stanovenia

Pri stanovení UDS v bunkách kultúry sa nezapočítavajú jadrá v S fáze. Počíta sa minimálne 50 buniek na koncentráciu. Sklíčka sa musia pre počítaním označiť. Na každom sklíčku je potrebné počítať niekoľko ďaleko od seba uložených, samostatných náhodných polí. Úroveň začlenenia $^{3}$H-TdR v cytoplazme by sa mala určiť zrátaním oblastí trojnásobnej veľkosti jadra v cytoplazme každej rátanej bunky.

Stanovenie LSC

Pri stanovení UDS pomocou LSC sa používa primeraný počet kultúr pre každú koncentráciu a v kontrolách.

Všetky výsledky je potrebné potvrdiť v nezávislom experimente.

## 2. ÚDAJE

Údaje sa prezentujú vo forme tabuliek.

### 2.1. Autorádiografické stanovenia

Rozsah inkorporácie $^{3}$H-TdR do cytoplazmy a množstvo zŕn nájdených v bunkovom jadre sa zaznamenávajú osobitne.

Priemer, medián a modus sa môžu použiť na opis distribúcie rozsahu inkorporácie $^{3}$H-TdR do cytoplazmy a množstva granúl na jadro.

### 2.2. Stanovenia LSC

Na stanovenie LSC sa inkorporácia $^{3}$H-TdR udáva dpm/μg DNA. Na opis rozdelenia inkorporácie sa môže použiť priemerná hodnota dpm/μg DNA so štandardnou odchýlkou.

Dáta sa hodnotia pomocou vhodných štatistických metód.

## 3. SPRÁVA

### 3.1. Správa z testu

V prípade, že je to možné, správa z testu obsahuje tieto informácie:

— použité bunky, hustota a číslo pasážovania v čase vystavenia, počet bunkových kultúr,

— metódy používané na udržiavanie bunkových kultúr zahŕňajúce živnú pôdu, teplotu a koncentráciu $CO_2$,

— testovanú látka, nosič, koncentrácie a podklady pre výber použitých koncentrácií v teste,

— podrobnosti o metabolických aktivačných systémoch,

— rozvrh ovplyvnenia,

— pozitívne a negatívne kontroly,

— použité autorádiografické metódy,
— postupy použité na zablokovanie vstupu buniek do S fázy,
— postupy na extrakciu DNA a stanovenie celkového obsahu DNA pri určení LSC,
— ak je to možné, vzťah dávka/efekt,
— štatistické vyhodnotenie,
— diskusiu o výsledkoch,
— interpretáciu výsledkov.

3.2. **Vyhodnotenie a interpretácia**

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

TEST VÝMENY SESTERSKÝCH CHROMATÍD *IN VITRO*

## 1. METÓDA

### 1.1. Úvod

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.2. Definícia

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.3. Referenčné látky

Žiadne.

### 1.4. Princíp testovacej metódy

Test výmeny sesterských chromatíd (SCE) je krátkodobý test na určenie recipročnej výmeny DNA medzi dvomi sesterskými chramatidami duplikovaných chromozómov. SCE predstavuje výmenu produktov DNA replikácie v zdanlivo homologických lokusoch. Proces výmeny pravdepodobne zahŕňa zlom DNA a znovuspojenie, hoci o jeho molekulárnom mechanizme existuje málo poznatkov. Stanovenie SCE vyžaduje niektoré techniky odlišne značených sesterských chromatíd, čo sa dá dosiahnuť inkorporáciou brómdeoxyuridínu (BrdU) do chromozomálnej DNA počas dvoch bunkových cyklov.

Ak je to vhodné, cicavčie bunky sa *in vitro* vystavia testovanej chemikálii tak v prítomnosti ako aj v neprítomnosti cicavčieho exogénneho metabolického aktivačného systému a inkubujú sa počas dvoch kôl replikácie v médiu obsahujúcom BrdU. Po ovplyvnení inhibítorom deliaceho vretienka (napr. kolchicínom), s cieľom nahromadenia buniek v štádiu podobnom metafáze mitózy (c-metafáza), sa bunky zozbierajú a vykoná sa izolácia chromozómov.

### 1.5. Kritériá kvality

Žiadne.

### 1.6. Opis testovacej metódy

*Príprava*

— Primárne kultúry (ľudské lymfocyty) alebo stabilné bunkové línie (napr. bunky vaječníkov čínskeho škrečka) sa používajú v teste. Bunkové línie sa musia kontrolovať na kontamináciu mykoplazmou.

— Používajú sa vhodné kultivačné médiá a inkubačné podmienky (napr. teplota, kultivačné nádoby, koncentrácia $CO_2$ a vlhkosť).

— Pred vystavením buniek môžu byť testované látky pripravené v kultivačnom médiu alebo rozpustené, alebo rozsuspendované vo vhodnom nosiči. Konečná koncentrácia nosiča v kultivačnom systéme by nemala významne ovplyvňovať životaschopnosť buniek alebo rýchlosť rastu a vplyvy na frekvenciu SCE sa musia monitorovať kontrolou s rozpúšťadlom.

— Bunky sa vystavujú testovanej látke ako v prítomnosti tak i v neprítomnosti exogénneho cicavčieho metabolického aktivačného systému. Ak sa eventuálne používajú typy buniek s endogénnou metabolickou aktivitou, miera a podstata aktivity by mala byť primeraná testovanej triede chemikálií.

*Testovacie podmienky*

Počet kultúr

Pre každý bod experimentu sa musia použiť minimálne zdvojené kultúry.

Použitie negatívnych a pozitívnych kontrol

Do každého experimentu by sa mali zahrnúť pozitívne kontroly využívajúce priamo pôsobiace zlúčeniny, ako aj zlúčeniny vyžadujúce metabolickú aktiváciu; tiež sa musí použiť nosičová kontrola.

Nasledujú príklady látok, ktoré sa môžu použiť ako pozitívna kontrola:

— priamo pôsobiaca zlúčenina:

  — etylmetánsulfonát,

— nepriamo pôsobiaca zlúčenina:

  — cyklofosfamid.

V prípade, že je to vhodné, môže sa zahrnúť ďalšia pozitívna kontrola rovnakej chemickej triedy ako testovaná chemikália.

Expozičné koncentrácie

Mali by sa použiť minimálne tri zodpovedajúco rozložené koncentrácie testovanej látky. Najvyššia koncentrácia by mala vyvolať významný toxický účinok, ale napriek tomu musí umožniť uskutočnenie bunkového delenia. Vo vode ťažko rozpustné látky by sa mali testovať až do hranice rozpustnosti použitím vhodných procedúr. Pre ľahko rozpustné netoxické látky by horná koncentrácia testovanej látky mala byť určená od prípadu k prípadu.

*Postup*

Príprava kultúr

Stabilné bunkové línie sa získajú zo zásobnej kultúry (napr. trypsinizáciou alebo pretrepávaním), naočkujú do kultivačnej nádoby v primeranej hustote a inkubujú pri 37 °C. Pri monovrstvových kultúrach sa počet buniek v kultivačnej nádobe prispôsobí tak, aby kultúry v období zberania neboli splynuté na viac ako 50 %. Bunky sa prípadne môžu použiť v suspenznej kultúre. Kultúry ľudských lymfocytov sa zakladajú z heparinizovanej krvi pri použití primeraných techník a inkubujú pri 37 °C.

Vystavenie

Bunky v exponenciálnej fáze rastu sa vystavia testovanej látke na vhodnú dobu; vo väčšine prípadov môžu byť účinné jednu až dve hodiny, ale v niektorých prípadoch sa môže čas vystavenia predĺžiť až na dva úplné bunkové cykly. Bunky bez dostatočnej endogénnej metabolickej aktivity by sa mali vystaviť testovanej chemikálii v prítomnosti ako aj v neprítomnosti vhodného metabolického aktivačného systému. Na konci fázy vystavenia sa bunky premyjú a zbavia testovanej látky a kultivujú na dve kolá replikácie v prítomnosti BrdU. Ako alternatívny postup môžeme bunky vystaviť súčasne testovanej látke a BrdU na celý kultivačný čas dvoch cyklov.

Kultúry ľudských lymfocytov sa vystavia, pokiaľ sa nachádzajú v semisynchrónnych podmienkach.

Bunky sa analyzujú počas ich druhého delenia po vystavení tak, aby sa zaručilo, že väčšina citlivých fáz bunkového cyklu bola vystavená chemikálii. Všetky kultúry, ku ktorým je pridaný BrdU, sa musia spracovávať až do zberania buniek v tme alebo pri tlmenom osvetlení zo žiarivkových lámp tak, aby sa minimalizovala fotolýza DNA obsahujúcej BrdU.

Zberanie buniek

Bunkové kultúry sa vystavia inhibítorom deliaceho vretienka (napr. kolchicínom) na jednu až štyri hodiny pred zberom. Každá kultúra sa samostatne zozbiera a spracuje na izoláciu chromozómov.

Izolácia chromozómov a farbenie

Izolácia chromozómov sa vykoná štandardnými cytogenetickými postupmi. Farbenie sklíčok na dôkaz SCE sa môže vykonať niekoľkými postupmi, (napr. fluorescencia plus Giemsova metóda).

Analýza

Počet analyzovaných buniek by sa mal zakladať na spontánnej kontrolnej frekvencii SCE. Zvyčajne sa na výskyt SCE analyzuje minimálne 25 dobre rozprestrených metafáz na kultúru. Sklíčka sa pred analýzou označia. V ľudských lymfocytoch sa analyzujú iba metafázy obsahujúce 46 centromér. V stabilných bunkových líniách sa analyzujú iba metafázy obsahujúce ± 2 centroméry zvyčajného počtu. Je potrebné stanoviť, či je, alebo nie je zarátaná zmena farieb v oblasti centromér ako SCE. Výsledky sa potvrdia nezávislým experimentom.

2. **ÚDAJE**

Údaje sa prezentujú vo forme tabuliek.

Počet SCE pre každú metafázu a počet SCE pre chromozóm každej metafázy sa uvedie osobitne pre všetky ovplyvnené a kontrolné kultúry.

3. **SPRÁVA**

3.1. **Správa z testu**

V prípade, že je to možné, správa z testu obsahuje tieto informácie:

— použité bunky, metódy na udržiavanie bunkových kultúr,

— testovacie podmienky: zloženie živných pôd, koncentrácia $CO_2$, koncentrácia testovanej látky, použitý nosič, inkubačná teplota, čas ovplyvnenia, použitý inhibítor deliaceho vretienka, jeho koncentrácia a trvanie ovplyvnenia, typ použitého cicavčieho aktivačného systému, pozitívnu a negatívnu kontrolu,

— počet bunkových kultúr na každý krok experimentu,

— podrobnosti o technikách použitých na preparáciu sklíčok,

— počet analyzovaných metafáz (údaje dané samostatne pre každú kultúru),

— priemerný počet SCE na bunku a na chromozóm (údaje dané samostatne pre každú kultúru),

— kritéria pre určovanie SCE,

— podklady pre výber dávok,

— ak je možné, vzťah dávka/efekt,

— štatistické vyhodnotenie,

— diskusiu o výsledkoch,

— interpretáciu výsledkov.

3.2. **Vyhodnotenie a interpretácia**

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

TEST NA ZACHYTENIE RECESÍVNYCH LETÁLNYCH MUTÁCIÍ VIAZANÝCH NA POHLAVIE PRI *DROSOPHILA MELANOGASTER*

## 1. METÓDA

### 1.1. Úvod

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.2. Definícia

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.3. Referenčné látky

Žiadne.

### 1.4. Princíp testovacej metódy

Test na zachytenie recesívnych letálnych mutácií viazaných na pohlavie (SLRL) využívajúci *Drosophila melanogaster* zisťuje výskyt mutácií, bodových mutácií aj malých delécií, v zárodočných líniách tohto hmyzu. Tento test je testom na priame mutácie, ktorý umožňuje skríning mutácií v približne 800 lokusoch na X - chromozóme; toto reprezentuje okolo 80 % všetkých lokusov X - chromozómu. X - chromozóm predstavuje približne jednu pätinu celého haploidného genómu.

Mutácie na X - chromozóme *Drosophila melanogaster* sa fenotypovo exprimujú u samčích nosičov mutantného génu. Ak je letálna mutácia v hemizygotných podmienkach, jej prítomnosť sa vyvodzuje z neprítomnosti jednej triedy z dvoch tried samčích potomkov, ktoré sa normálne vytvárajú z heterozygotnej samičky. SLRL test využíva výhody tohto faktu prostredníctvom špeciálne označených a upravených chromozómov.

### 1.5. Kritériá kvality

Žiadne.

### 1.6. Opis testovacej metódy

*Príprava*

Línie

Používajú sa samci dobre charakterizovanej štandardnej línie a samičky línie Muller-5. Použiť sa môžu aj iné vhodne označené samičie línie s mnohonásobne invertovanými X chromozómami.

Testovaná látka

Testované látky sa musia rozpustiť vo vode. Látky, ktoré nie sú rozpustné vo vode, sa môžu rozpustiť alebo rozsuspendovať vo vhodnom nosiči (napr. zmesi etanolu a Tween-60 alebo 80) a pred podávaním rozriediť vo vode alebo v roztoku soli. Ako nosič by sa nemal použiť dimetylsulfoxidu (DMSO).

Počet zvierat

Test by sa mal zostaviť s vopred určenou citlivosťou a silou. Na počet ovplyvnených chromozómov, ktorý sa musí analyzovať, bude výrazne vplývať spontánna mutačná frekvencia pozorovaná vo vhodnej kontrole.

Spôsob podávania

Vystavenie sa môže uskutočniť orálne, injekciou alebo prostredníctvom vystavenia plynom alebo parám. Podávanie testovanej látky kŕmením sa môže uskutočniť pridaním látky do cukrového roztoku. Ak je to nutné, látky sa môžu rozpustiť v 0,7 % NaCl roztoku a injekciou vpraviť do hrude alebo do bruška.

Použitie negatívnej a pozitívnej kontroly

Do testu by sa mala zahrnúť negatívna (nosič) a pozitívna kontrola. Ak sú však dostupné vhodné laboratórne údaje o kontrolách z minulosti, nie je potrebná žiadna súbežná kontrola.

Hodnoty vystavenia

Použiť by sa mali tri expozičné hodnoty. Na predbežné stanovenie sa môže použiť jedna expozičná hodnota testovanej látky. Vtedy expozičná hodnota je buď maximálna tolerovaná hodnota, alebo taká, ktorá má za následok určitý náznak toxicity. Pre netoxické látky by sa mala použiť expozícia na maximálnu používanú koncentráciu.

*Postup*

Samci štandardného fenotypu (starí tri až päť dní) sa ovplyvňujú testovanými látkami a jednotlivo sa pária s množstvom panenských samičiek z línie Muller-5 alebo z inej vhodne označenej línie (s mnohonásobne invertovanými X-chromozómami). Každé dva až tri dni sa samičky nahradia novými panenskými samičkami s cieľom pokryť celý zárodočný bunkový cyklus. Potomstvo týchto samičiek sa vyhodnotí vzhľadom na letálne vplyvy zodpovedajúce vplyvom na zrelú spermiu, stredným alebo neskorým stavom spermatíd, skorým spermatidám, spermatocytom a spermatogóniam v čase ovplyvňovania.

Heterozygotným $F_1$ samičkám z vyššie uvedených krížení sa umožňuje páriť sa jednotlivo (t. j. jedna samička na nádobku) s ich bratmi. V $F_2$ generácii sa každá kultúra je vyhodnotí vzhľadom na neprítomnosť štandardných samčích typov. Ak sa zdá, že kultúra vyrástla z $F_1$ samičky nesúcej letálnu mutáciu v rodičovskom X-chromozóme (t. j. nepozorujú sa žiadni samci s ovplyvneným chromozómom), dcéry tejto samičky s rovnakým genotypom sa musia testovať, aby sme zistili, či sa letalita opakuje v nasledujúcej generácii.

## 2. ÚDAJE

Údaje sa znázornia do tabuľky s cieľom ukázať počet testovaných X - chromozómov, počet neplodných samcov, počet letálnych chromozómov v každej expozičnej koncentrácii a pre každú periódu párenia na každého skúmaného samca. Dokumentovať sa musí počet zhlukov rozdielnych veľkostí vzhľadom na jedného samca. Tieto výsledky sa potvrdia nezávislým experimentom.

Pri vyhodnocovaní testov na pohlavie viazanú recesívnu letalitu by sa mali použiť vhodné štatistické metódy. Zhlukovanie recesívnych letálnych mutácií pochádzajúcich z jedného samca sa skúmajú a vyhodnocujú vhodným štatistickým spôsobom.

## 3. SPRÁVA

### 3.1. Správa z testu

V prípade, že je to možné, správa z testu obsahuje tieto informácie:

— zásobná línia: použité línie *Drosophila* alebo kmene, vek hmyzu, počet ovplyvnených samcov, počet sterilných samcov, počet stabilných $F_2$ kultúr, počet $F_2$ kultúr bez potomstva, počet chromozómov nesúcich letálnu mutáciu, ktoré sú zistené v každom zárodočnom bunkovom štádiu,

— kritériá pre vytvorenie veľkosti ovplyvňovaných skupín,

— testovacie podmienky: podrobný opis ovplyvňovania a odberu náhodných vzoriek, expozičné koncentrácie, údaje o toxicite, prípadne negatívne (rozpúšťadlo) a pozitívne kontroly,

— kritériá vyhodnocovania letálnych mutácii,

— vzťah expozícia/efekt tam, kde je to možné,

— zhodnotenie dát,

— diskusiu o výsledkoch,

— interpretáciu výsledkov.

### 3.2. Vyhodnotenie a interpretácia

Pozri všeobecný úvod časť B.

## 4. LITERATÚRA

Pozri všeobecný úvod časť B.

TESTY BUNKOVEJ TRANSFORMÁCIE CICAVČÍCH BUNIEK *IN VITRO*

## 1. METÓDA

### 1.1. Úvod

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.2. Definícia

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.3. Referenčné látky

Žiadne.

### 1.4. Princíp testovacej metódy

Systémy kultúr cicavčích buniek sa používajú na určenie fenotypových zmien indukovaných *in vitro* chemickými látkami, ktoré súvisia s malígnou transformáciou *in vivo*. Medzi často používané bunky patria C3H10T½, 3T3, SHE, Fischer bunky potkanov. Testy sa zakladajú na zmenách bunkovej morfológie, vytváraní ohnísk alebo zmenách v schopnosti priľnúť na polopevnom agare. Existujú aj menej používané systémy, ktoré detekujú iné fyziologické a morfologické zmeny v bunkách, vznikajúce ako dôsledok vystavenia karcinogénnym chemikáliám. Žiadny zo záverov *in vitro* testov nepreukázal mechanické spojenie s rakovinou. Niektoré z testovacích systémov majú schopnosť odhaľovať nádorové promótory. Cytotoxicita sa môže určiť meraním vplyvu testovaného materiálu na schopnosti tvorby kolónií (klonovacia účinnosť) alebo meraním rýchlosti rastu kultúr. Meranie cytotoxicity má za cieľ preukázať, že vystavenie testovanej chemikálii bolo toxikologicky závažné, ale nemôže sa použiť na výpočet frekvencie transformácií vo všetkých testoch, keďže niektoré môžu vyžadovať predĺženú inkubáciu a/alebo opätovné naočkovanie.

### 1.5. Kritériá kvality

Žiadne.

### 1.6. Opis testovacej metódy

*Príprava*

Bunky

Dostupné sú rozmanité bunkové línie alebo primárne bunky a to v závislosti od použitého transformačného testu. Výskumník musí zaručiť, aby bunky v uskutočňovanom teste vykazovali vhodnú zmenu fenotypu po vystavení známym karcinogénom a aby test v laboratóriu výskumníka bol dokázateľne platný, spoľahlivý a zdokumentovaný.

Médium

Používajú sa médiá a experimentálne podmienky, ktoré zodpovedajú používanému transformačnému testu.

Testovaná látka

Testované látky sa môžu pripraviť v kultivačnom médiu alebo rozpustiť, alebo rozsuspendovať vo vhodnom nosiči predtým, ako dôjde k ovplyvneniu buniek. Konečná koncentrácia nosiča v kultivačnom systéme by nemala ovplyvňovať životaschopnosť bunky, rýchlosť rastu alebo výskyt transformácií.

Metabolická aktivácia

Bunky majú byť vystavené testovanej látke tak v prítomnosti ako aj v neprítomnosti vhodného metabolického aktivačného systému. V eventuálnom prípade, keď sa používajú typy buniek s endogénnou metabolickou aktivitou, by malo byť známe, že povaha aktivity je vhodná pre testované chemické triedy.

*Testovacie podmienky*

Použitie negatívnych a pozitívnych kontrol

Pozitívne kontroly, ktoré využívajú priamo pôsobiace zlúčeniny a zlúčeniny vyžadujúce metabolickú aktiváciu, majú byť súčasťou každého experimentu; negatívnu kontrolu (nosič) je taktiež potrebné použiť.

Nasledujú príklady látok, ktoré môžu byť použité ako pozitívna kontrola:

— priamo pôsobiace chemikálie:

  — etylmetánsulfonát,

  — β-propiolaktón,

— zlúčeniny vyžadujúce metabolickú aktiváciu:

  — 2-acetylaminofluorén,

  — 4-dimetylaminoazobenzén,

  — 7,12-dimetylbenzantracén.

V prípade, že je to primerané, mala by sa zahrnúť ďalšia pozitívna kontrola rovnakej chemickej triedy, ako je testovaná látka.

Koncentrácie vystavenia

Používa sa niekoľko koncentrácií testovanej látky. Tieto koncentrácie majú poskytovať toxický efekt spôsobený koncentráciou, najvyššia koncentrácia spôsobujúca nízku úroveň prežívania a prežívanie pri najnižšej koncentrácii by malo byť približne rovnaké ako pri negatívnej kontrole. Vo vode ťažko rozpustné látky sa majú testovať až do úrovne rozpustnosti s použitím vhodných postupov. Pre voľne rozpustné netoxické látky sa horná koncentrácia testovanej látky určuje od prípadu k prípadu.

*Postup*

Na základe použitého testovacieho systému sa bunky ovplyvňujú počas primeraného časového intervalu a ak je vystavenie predĺžené, môže zahŕňať opätovné vystavenie sprevádzané výmenou živnej pôdy (a ak je nevyhnutné, čerstvou zmesou metabolického aktivátora). Bunky bez dostatočnej endogénnej metabolickej aktivity sa vystavujú testovanej látke ako v prítomnosti tak aj v neprítomnosti vhodného metabolického aktivačného systému. Na konci doby vystavenia sa bunky premyjú, zbavia testovanej látky a kultivujú za podmienok vhodných na monitorovanie transformovaného fenotypu a stanoví sa rozsah zistených transformácií. Všetky výsledky sa potvrdia nezávislým experimentom.

## 2. ÚDAJE

Údaje sa prezentujú vo forme tabuliek v rôznych formách v závislosti na uskutočnenom teste, napr. zhodnotenie platní, pozitívne platne alebo počet transformovaných buniek. V prípadoch, kde je to možné, prežívanie sa má vyjadriť ako percento úrovne hodnôt kontrolných vzoriek a frekvencia transformácie sa má vyjadriť ako počet transformantov na počet prežívajúcich buniek. Údaje sa vyhodnocujú pomocou vhodných štatistických metód.

## 3. SPRÁVA

### 3.1. Správa z testu

V prípade, že je to možné, správa z testu obsahuje nasledujúce informácie:

— použitý typ buniek, počet bunkových kultúr, metódy na udržiavanie bunkových kultúr,

— testovacie podmienky, koncentrácia testovanej látky, použitý nosič, inkubačný čas, trvanie a frekvenciu ovplyvňovania, hustotu buniek počas ovplyvňovania, typ použitého exogénneho metabolického aktivačného systému, pozitívne a negatívne kontroly, špecifikáciu sledovaného fenotypu, použitý selekčný systém (ak je potrebný), odôvodnenie výberu dávok,

— použité metódy na výpočet počtu životaschopných a transformovaných buniek,
— štatistické vyhodnotenie,
— diskusiu o výsledkoch,
— interpretáciu výsledkov.

3.2. **Vyhodnotenie a interpretácia**

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

DOMINANTNÝ LETÁLNY TEST U HLODAVCOV

## 1. METÓDA

### 1.1. Úvod

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.2. Definícia

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.3. Referenčné látky

Žiadne.

### 1.4. Princíp testovacej metódy

Dominantné letálne vplyvy spôsobujú smrť embrya alebo plodu. Vyvolanie dominantných letálnych mutácií ovplyvnením chemickou látkou naznačuje, že látka ovplyvnila zárodočné tkanivá testovaného druhu. Všeobecne sa usudzuje, že dominantné letálne mutácie majú pôvod v poškodeniach chromozómov (štrukturálnych a numerických anomáliách). Smrť embrya ovplyvnených samičiek môže byť tiež výsledkom toxických vplyvov.

Vo všeobecnosti sa samčí jedinci vystavia testovanej zlúčenine a pária sa s neovplyvnenými panenskými samičkami. Samostatne sa môžu testovať rozličné štádiá zárodočných buniek s využitím postupných intervalov kríženia. Zvýšenie počtu mŕtvych implantátov na samičku v ovplyvnenej skupine v porovnaní s počtom mŕtvych implantátov na samičku v kontrolnej skupine odráža postimplantačné straty. Predimplantačné straty sa môžu stanoviť na základe počítania žltých teliesok (*corpora lutea*) alebo porovnaním všetkých implantátov na samičku vo vystavenej a v kontrolnej skupine. Celkový dominantný letálny vplyv je súčet pred a postimplantačných strát. Výpočet celkového dominantného letálneho vplyvu je založený na porovnaní počtu živých implantátov na samičku v testovanej skupine k počtu živých implantátov na samičku v kontrolnej skupine. Zníženie počtu implantátov v určitých obdobiach môže byť výsledkom usmrtenia buniek (napr. spermatocytov a/alebo spermatogónií).

### 1.5. Kritériá kvality

Žiadne.

### 1.6. Opis testovacej metódy

*Príprava*

V prípade, že je to možné, sa testované látky rozpustia alebo rozsuspendujú vo fyziologickom roztoku. Chemikálie vo vode nerozpustné sa rozpustia alebo rozsuspendujú vo vhodných nosičoch. Použitý nosič nesmie ovplyvňovať testovanú chemikáliu, ani spôsobovať toxické účinky. Vykonaná musí byť čerstvá príprava testovanej chemikálie.

*Podmienky testu*

Spôsob podávania

Vo všeobecnosti sa testovaná látka podáva iba raz. Na základe toxikologických informácií možno použiť opakovaný harmonogram vystavenia. Zvyčajný spôsob podávania je orálna intubácia alebo intraperitoneálna injekcia. Vhodnými môžu byť aj iné spôsoby podávania.

Experimentálne zvieratá

Ako testovacie druhy sa preferujú potkany alebo myši. Zdravé a pohlavne zrelé zvieratá sa náhodne roztriedia do skupiny na vystavenie a do kontrolnej skupiny.

Počet a pohlavie

Mal by sa použiť primeraný počet vystavených samcov, berúc pritom do úvahy spontánnu zmenu hodnoteného biologického druhu. Zvolený počet by mal vychádzať z vopred určenej citlivosti detekcie a sile významnosti. V typickom teste napríklad by mal počet samcov v skupine každej dávky stačiť na dosiahnutie 30 až 50 gravidných samíc v danom intervale kríženia.

Použitie negatívnej a pozitívnej kontroly

Do každého experimentu sa zahŕňajú súbežné pozitívne a negatívne kontroly. Ak sú k dispozícii akceptovateľné výsledky pozitívnej kontroly z nedávno uskutočnených experimentov v rovnakom laboratóriu, je možné použiť tieto výsledky miesto súbežnej pozitívnej kontroly. Na preukázanie citlivosti testu sa používajú látky pozitívnej kontroly v prijateľne nízkej dávke (napr. MMS, intraperitoneálne, 10 mg/kilogram).

Úrovne dávok

Zvyčajne sa používajú tri rôzne dávky. Vysoká dávka by mala poskytovať dôkazy o toxicite alebo redukovanej plodnosti ovplyvnených zvierat. V niektorých prípadoch postačuje jediná vysoká dávka.

Hraničný test

Pri jednorazovom podaní sa netoxické látky testujú pri 5 g/kilogram alebo pri opakovanom podávaní pri 1 g/kilogram/deň.

*Postup*

Existuje niekoľko harmonogramov vystavenia. Jednorazové podanie testovanej látky je najrozšírenejšie. Môžu sa použiť aj iné harmonogramy ovplyvňovania.

Jednotliví samci sa postupne pária s jednou alebo dvoma neovplyvnenými panenskými samicami vo vhodných časových obdobiach po ovplyvnení. Samice sa musia ponechať so samcami po dobu trvania aspoň jedného ovulačného cyklu alebo pokým nedôjde k páreniu, toto sa stanoví na základe prítomnosti spermií vo vagíne alebo prítomnosťou vaginálnej zátky.

Počet párení po ovplyvnení je daný harmonogramom ovplyvnenia a musí zabezpečovať, že sa po ovplyvnení zachytia všetky štádiá zárodočných buniek.

Samice sa usmrtia v druhej polovici gravidity a vyšetrí sa obsah maternice tak, aby sa stanovil počet mŕtvych a živých implantátov. Vaječníky sa môžu vyšetriť na stanovenie počtu žltých teliesok.

2. **ÚDAJE**

Údaje sa prezentujú vo forme tabuliek, ktoré ukazujú počet samcov, počet gravidných samíc a počet negravidných samíc. Výsledky každého kríženia zahŕňajúce pôvod každého samca a samice by sa mali zachytiť samostatne. U každej samice je potrebné opísať týždeň párenia, dávku, ktorou bol ovplyvnený samec, frekvenciu živých implantátov a frekvenciu mŕtvych implantátov.

Výpočet celkového dominantného letálneho vplyvu je založený na porovnaní počtu živých implantátov na samicu v testovanej skupine k počtu živých implantátov v kontrolnej skupine. Na stanovenie postimplantačných strát sa analyzuje pomer mŕtvych a živých implantátov z ovplyvnenej skupiny porovnaný s rovnakým pomerom z kontrolnej skupiny.

V prípade, že sú údaje zaznamenané ako skorá a neskorá smrť, musí sa na to poukázať v tabuľkách. Je potrebné uviesť, či sú odhadnuté predimplantačné straty. Predimplantačné straty sa vypočítajú ako rozdiel medzi počtom žltých teliesok a počtom implantátov alebo ako zníženie priemerného počtu implantátov na maternicu v porovnaní s kontrolnými pármi.

Údaje sú vyhodnocované pomocou vhodných štatistických metód.

3. **SPRÁVA**

3.1. **Správa z testu**

V prípade, že je to možné, správa z testu obsahuje tieto informácie:

— druh, kmeň, vek a hmotnosť použitých zvierat, počet zvierat každého pohlavia v experimentálnej a kontrolnej skupine,

— testovaná látka, nosič, testované dávky a podklady pre výber dávok, negatívna a pozitívna kontrola, údaje o toxicite,

— spôsob podávania a harmonogram ovplyvňovania,

— harmonogram párenia,

— metódy použité na dôkaz, že sa uskutočnilo párenie,

— čas usmrtenia,

— kritériá na stanovenie dominantných letálnych mutácií,

— ak je to možné, vzťah dávka/efekt,

— štatistické vyhodnotenie,

— diskusiu o výsledkoch,

— interpretáciu výsledkov.

3.2. **Vyhodnotenie a interpretácia**

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

CYTOGENETIKA CICAVČÍCH ZÁRODOČNÝCH BUNIEK *IN VIVO*

1. **METÓDA**

1.1. **Úvod**

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. **Definícia**

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.3. **Referenčné látky**

Žiadne.

1.4. **Princíp testovacej metódy**

Predkladaný *in vivo* cytogenetický test stanovuje štrukturálne chromozómové aberácie v spermatogóniach. Pozostáva z analýzy spermatogonálnych mitóz pre chromatidové a chromozómové typy aberácií.

Metóda využíva preparáciu semenníkov cicavcov, ktorí sa vhodným podaním vystavili testovaným chemikáliám a usmrtili v rôznych časových intervaloch. Následné sa zvieratá pred usmrtením vystavujú inhibítorom deliaceho vretienka, akým je kolchicín tak, aby sa nahromadili bunky v metafáze podobnom štádiu mitózy (c-mitóza). Zhotovia sa vysušené chromozómové preparáty, ktoré sa farbia a mikroskopicky analyzujú.

Ďalšie užitočné informácie môže poskytnúť analýza spermatocytov v diakinéze – metafáze I zameraná na translokačné multivalenty po ovplyvnení spermatogonálnych kmeňových buniek.

1.5. **Kritériá kvality**

Žiadne.

1.6. **Opis testovacej metódy**

*Príprava*

Testované chemikálie sa rozpustia vo fyziologickom roztoku. V prípade, že sú nerozpustné, rozpustia sa alebo rozsuspendujú vo vhodnom nosiči. Používajú sa čerstvo pripravené roztoky testovaných látok. Ak je použitý nosič na uľahčené dávkovania, tento nesmie ovplyvňovať testovanú látku alebo spôsobovať toxické vplyvy.

Spôsob podávania

Testované zlúčeniny by sa mali vo všeobecnosti podať len raz. So zreteľom na toxikologické informácie sa môže uskutočniť opakované vystavenie. Opakované vystavenie sa však môže aplikovať len v tom prípade, ak testovaná látka nevykazuje vysoký cytotoxický účinok na diferencujúcich sa spermatogóniach.

Zvyčajný spôsob podávania je orálna alebo intraperitoneálna injekcia. Vhodné môžu byť aj iné spôsoby podávania.

Experimentálne zvieratá

Najčastejšie sa používajú myši a čínski škrečkovia. Použiť sa môžu aj akékoľvek iné cicavčie druhy.

Používajú sa pohlavne zrelí samci náhodne rozdelení do ovplyvňovanej a kontrolnej skupiny.

Počet zvierat

Používa sa aspoň päť samcov na experimentálnu a päť samcov na kontrolnú skupinu.

Použitie negatívnej a pozitívnej kontroly

V každom experimente by mali byť obsiahnuté súbežné pozitívne a negatívne (nosičové) kontroly.

Na dôkaz citlivosti testu sa používajú látky pozitívnej kontroly v primerane nízkych dávkach (napr. mitomycín C, intraperitoneálne, pri 0,3 mg/kilogram).

Úrovne dávok

Používa sa jedna dávka testovanej zlúčeniny, dávka je maximálnou prípustnou dávkou alebo takou dávkou, ktorá vyvoláva určité náznaky cytotoxicity. Ak táto dávka vyvoláva vysokú úmrtnosť buniek, potom by sa mala použiť ďalšia nižšia dávka vykazujúca cytotoxicitu. Potrebné sú aspoň tri dávky v prípade, že je nevyhnutné stanoviť vzťah dávka/efekt (napr. potvrdiť slabú pozitívnu odpoveď). Netoxické látky by sa mali testovať pri najvyšších dosiahnuteľných dávkach tak pri jednorazovom, ako aj pri opakovanom podávaní.

*Postup*

Zvieratá sa zvyčajne vystavujú testovanej zlúčenine iba raz. V skupine s najvyššou dávkou sa po vystavení používajú tri intervaly na odoberanie vzoriek. Stredný interval odoberania vzoriek je 24 hodín. Keďže kinetika bunkového cyklu môže byť ovplyvnená testovanou látkou, aplikuje sa jeden skorší a jeden neskorší interval na odobratie vzoriek, ktorý je primerane rozdelený v rozsahu 6 až 48 hodín. Pre dodatočné úrovne dávok sa musia vybrať vzorky predovšetkým z citlivého obdobia alebo, ak toto nie je známe, 24 hodín po vystavení.

Prípadne sa môže použiť opakované ovplyvňovanie a zvieratá by sa mali usmrtiť 24 hodín po poslednom ovplyvnení. Využiť sa môže ďalší čas na odobratie vzoriek v rozpätí 6 až 24 hodín.

Preparácia semenníkov

Na analýzu spermatogonálnych mitóz sa zvieratám intraperitoneálne vpichne dostačujúca dávka inhibítora mitotického vretienka, akým je kolchicín. Následne sa zvieratá usmrtia v primeranom časovom období. U myší sa tento interval mení od troch do piatich hodín, u čínskeho škrečka je potrebných viac ako päť hodín.

Používa sa technika sušenia na vzduchu. Rôzne druhy môžu vyžadovať modifikácie štandardného postupu. Získajú sa suspenzie buniek, ktoré sa ovplyvnia hypotonickým roztokom a fixujú sa. Bunky sa rozotrú na sklíčko a zafarbia sa. Sklíčka sa pred mikroskopickou analýzou označia.

Analýza

Vzhľadom na štruktúrne chromozómové aberácie sa analyzuje aspoň 100 dobre rozptýlených mitotických metafáz s úplným počtom centromér. Na podloženie možného cytotoxického vplyvu sa môže dodatočne stanoviť pomer spermatogonálnych mitóz k prvej a druhej meiotickej metafáze v úplnej vzorke 100 deliacich sa buniek na jedinca.

2. **ÚDAJE**

Údaje sa prezentujú vo forme tabuliek. Pre každé kontrolné a vystavené zviera sa osobitne uvedú všetky typy aberácií. Obsiahnutý je celkový počet analyzovaných buniek a celkový počet aberantných buniek na skupinu. Pre všetky parametre sa uvádzajú priemery a štandardná odchýlka. V prípade, ak je určený stredný pomer spermatogonálnych mitóz k prvej a druhej meiotickej metafáze, tento pomer sa zaznamená do tabuliek pre každú experimentálnu a kontrolnú skupinu.

Údaje sa vyhodnotia pomocou vhodných štatistických metód.

3. **SPRÁVA**

3.1. **Správa z testu**

V prípade, že je to možné, správa z testu obsahuje tieto informácie:

— druh a kmeň samcov, vek a hmotnosť samcov,

— počet zvierat v každej experimentálnej a kontrolnej skupine,

— podmienky testu, podrobný opis ovplyvnenia, úrovne dávok, rozpúšťadlá, použitý inhibítor mitotického vretienka,

— počet analyzovaných buniek na zviera v každej skupine,

— typy a počet aberácií na každé ovplyvnené a kontrolné zviera,

— štatistické vyhodnotenie,

— diskusiu o výsledkoch,

— interpretáciu výsledkov.

3.2. **Vyhodnotenie a interpretácia**

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

SPOT TEST U MYŠÍ

## 1. METÓDA

### 1.1. Úvod

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.2. Definícia

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.3. Referenčné látky

Žiadne.

### 1.4. Princíp testovacej metódy

Predkladaný test je *in vivo* test u myší, pri ktorom sa vyvíjajúce embryo vystaví chemikáliám. Cieľovými bunkami vo vyvíjajúcom sa embryu sú melanoblasty a cieľovými génmi sú také gény, ktoré podmieňujú pigmentáciu srsti. Vyvíjajúce sa embryá sú heterozygotné pre mnohé gény podmieňujúce sfarbenie srsti. Mutácia alebo strata (následkom rôznych genetických udalostí) dominantnej alely takéhoto génu v melanoblaste spôsobuje expresiu recesívneho fenotypu v bunkách potomstva, vytvárajúc tak škvrny zmenenej farby na srsti vzniknutej myši. Spočíta sa počet potomkov s týmito škvrnami, mutáciami a porovná sa ich frekvencia medzi potomstvom vzniknutým z embryí ovplyvnených iba rozpúšťadlom. Spot test u myší určuje predpokladané somatické mutácie vo fetálnych bunkách.

### 1.5. Kritériá kvality

Žiadne.

### 1.6. Opis testovacej metódy

*Príprava*

Ak je to možné, testované látky sa rozpustia alebo rozsuspendujú vo fyziologickom roztoku. Chemikálie nerozpustné vo vode sa rozpustia alebo rozsuspendujú vo vhodnom nosiči. Použitý nosič nesmie reagovať s testovanou látkou ani spôsobovať toxické účinky. Používa sa čerstvo pripravený roztok testovanej chemikálie.

Pokusné zvieratá

Myši kmeňa T (nonagouti, a/a; chinchilla, pink eye, $c^{ch}p/c^{ch}p$; brown, b/b, dilute, short ear, d se/d se; piebald spotting, s/s) sú párované buď s kmeňom HT (pallid, nonagouti, brachypody, pa a bp/pa a bp; leaden fuzzy, ln fz/ln fz; pearl, pe/pe), alebo s kmeňom C57BL (nonagouti, a/a). Ďalšie vhodné kríženia, akým je kríženie medzi kmeňom NMRI (nonagouti, a/a; albino, c/c) a kmeňon DBA (nonagouti, a/a; brown, b/b; dilute, d/d) sa môžu použiť v prípade, že ich výsledkom je nonagouti potomstvo.

Počet a pohlavie

Dostatočný počet gravidných samíc sa ovplyvňuje tak, aby sa získal primeraný počet potomkov pre každú použitú dávku. Vhodná veľkosť vzorky je daná počtom škvŕn pozorovaných u vystavených myší a rozsahom kontrolných dát. Negatívny výsledok je prijateľný iba v tom prípade, ak bolo hodnotených minimálne 300 potomkov samíc ovplyvnených najvyššou dávkou.

Použitie negatívnej a pozitívnej kontroly

K dispozícii by mali byť súbežné kontrolné údaje z myší vystavených len nosičom (negatívna kontrola). Pridať sa môžu historické kontrolné údaje z rovnakého laboratória tak, aby sa zvýšila citlivosť testu pod podmienkou, že sú homogénne. V prípade, že nie je zistený žiadny mutagénny účinok testovanej chemikálie, mali by byť dostupné údaje pozitívnej kontroly z vystavenia chemikálii, u ktorej bol dokázaný mutagénny účinok v tomto teste, nedávno získané v rovnakom laboratóriu.

Spôsob podávania

Zvyčajné spôsoby podávania sú orálna intubácia alebo peritoneálna injekcia gravidných samíc. Ak je to vhodné, používa sa ovplyvnenie inhaláciou alebo iné spôsoby podávania.

Úrovne dávok

Používajú sa aspoň dve úrovne dávok, z ktorých jedna vykazuje známky toxicity alebo zmenšenej veľkosti vrhu. Pre netoxické chemikálie by sa malo použiť vystavenie až do maximálnej dosiahnuteľnej dávky.

*Postup*

Jednorazové ovplyvnenie sa zvyčajne podáva na 8., 9. alebo 10. deň gravidity, pričom ako deň 1 sa uvažuje deň, keď je prvýkrát pozorovaná vaginálna zátka. Tieto dni zodpovedajú 7,25, 8,25 a 9,25 dňom po počatí. Počas týchto dní sa môžu použiť po sebe idúce ovplyvnenia.

Analýza

Potomstvo je označené a spočítané sú škvrny v čase medzi tretím a štvrtým týždňom po narodení. Rozlišujú sa tri triedy škvŕn:

a) biele škvrny do 5 mm od strednej ventrálnej línie, o ktorých sa predpokladá, že sú výsledkom odumierania buniek (WMVS);

b) žlté, aguti podobné, škvrny v oblastiach bradaviek, genitálií, v krčných, podpazušných a trieslových oblastiach a na strede čela, o ktorých sa predpokladá, že sú výsledkom chybnej diferenciácie (MDS) a

c) pigmentované a biele škvrny náhodne distribuované na srsti, o ktorých sa predpokladá, že sú výsledkom somatických mutácií (RS).

Všetky tri triedy sa vyhodnotia, ale iba posledná, RS, je geneticky významná. Problémy v rozlíšení medzi MDS a RS sa môžu vyriešiť fluorescenčnou mikroskopiou vzoriek chlpov.

Mali by sa zaznamenať zjavné hrubé morfologické abnormality potomstva.

2. **ÚDAJE**

Údaje sa predkladajú ako celkový počet hodnotených potomkov a počet tých, ktorí majú jednu alebo viacero predpokladaných somatických mutačných škvŕn. Ovplyvňovanie a negatívna kontrola sa porovnajú pomocou vhodných metód. Údaje sa uvádzajú podľa vrhov.

3. **SPRÁVA**

3.1. **V prípade, že je to možné**

V prípade, že je to možné, správa z testu bude obsahovať tieto informácie:

— kmene použité pri krížení,

— počet gravidných samíc v experimentálnej skupine a v kontrole,

— priemerná veľkosť vrhu v experimentálnej a v kontrolnej skupine pri narodení a po odstavení,

— úroveň (-ne) dávky testovanej chemikálie,

— použité rozpúšťadlo,

— deň gravidity, v ktorom bolo prevedené ovplyvnenie,

— spôsob ovplyvnenia,

— celkové množstvo hodnoteného potomstva a počet tých jedincov v experimentálne a kontrolnej skupine, ktoré majú WMVS, MDS a RS,

— hrubé morfologické abnormality,

— v prípade, že je to možné, vzťah dávka/efekt pri RS,

— štatistické vyhodnotenie,

— diskusiu o výsledkoch,

— interpretáciu výsledkov.

3.2. **Vyhodnotenie a interpretácia**

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

DEDIČNÁ TRANSLOKÁCIA U MYŠÍ

## 1. METÓDA

### 1.1. Úvod

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.2. Definícia

Pozri všeobecný úvod časť B.

### 1.3. Referenčné látky

Žiadne.

### 1.4. Princíp testovacej metódy

Test dedičnej translokácie u myší zisťuje štrukturálne a numerické chromozómové zmeny v cicavčích zárodočných bunkách po objavení sa v prvej generácii potomkov. Zistené typy chromozómových zmien sú recipročné translokácie a chromozómové straty v prípade, že je obsiahnuté samičie potomstvo. Nosiči translokácie a XO-samice vykazujú zníženú plodnosť, ktorá sa používa na selekciu $F_1$ potomstva pre cytogenetickú analýzu. Úplná neplodnosť je spôsobená istými typmi translokácií (X-autozóm, a c-t typ). Translokácie sa cytogeneticky pozorujú v meiotických bunkách v diakinéze metafázy I samčích jedincov a to buď $F_1$ samcov, alebo samčieho potomstva $F_1$ samíc. XO – samice sa cytogeneticky identifikujú prostredníctvom prítomnosti iba 39 chromozómov v mitózach kostnej drene.

### 1.5. Kritériá kvality

Žiadne.

### 1.6. Opis testovacej metódy

*Príprava*

Testované chemikálie sa rozpustia v fyziologickom roztoku. Ak sú nerozpustné, rozpúšťajú sa alebo rozsuspendujú vo vhodnom nosiči. Využívajú sa čerstvo pripravené roztoky testovanej zlúčeniny. Ak je na uľahčenie dávkovania použitý nosič, nesmie vzájomne reagovať s testovanou zlúčeninou alebo spôsobovať toxické efekty.

Spôsob podávania

Orálna intubácia alebo intraperitoneálna injekcia sú zvyčajnými spôsobmi podávania. Vhodné sú aj iné spôsoby podávania.

Pokusné zvieratá

Pre prípad rozmnožovania a cytologického overovania sa pokusy vykonávajú s myšou. Nevyžaduje sa žiaden špecifický kmeň. Priemerná veľkosť vrhu kmeňa by však mala byť väčšia ako osem a mala by byť relatívne stála. Používajú sa zdravé a pohlavne zrelé zvieratá.

Počet zvierat

Nevyhnutný počet zvierat závisí na frekvencii spontánnych translokácií a na získanie pozitívnych výsledkov sa vyžaduje minimálna rýchlosť indukcie.

Test sa zvyčajne vykonáva analýzou samčieho $F_1$ potomstva. Pre jednu dávkovú skupinu by sa malo testovať aspoň 500 samčích $F_1$ potomkov, 300 samcov a 300 samičiek sa požaduje v prípade, že sa zahŕňa samičie $F_1$ potomstvo.

Použitie negatívnej a pozitívnej kontroly

Dostupné by mali byť zodpovedajúce kontrolné dáta odvodené zo súbežnej a historickej kontroly. V prípade, že na základe súčasných pokusov prevedených v tom istom laboratóriu sú k dispozícii prijateľné výsledky pozitívnej kontroly, tieto výsledky sa môžu použiť miesto súbežnej pozitívnej kontroly.

Úrovne dávok

Testuje sa jedna úroveň dávky, zvyčajne najvyššia dávka spojená s produkciou minimálnych toxických efektov, ale bez vplyvu na reprodukčné správanie alebo prežívanie. Na zabezpečenie vzťahu dávky/efekt sa požadujú ďalšie dve nižšie dávky. Pre netoxické chemikálie by sa malo použiť vystavenie maximálnej dosiahnuteľnej dávke.

*Postup*

Ovplyvňovanie a párenie

K dispozícii sú dva harmonogramy ovplyvňovania. Jednorazové podávanie testovanej látky sa používa najčastejšie. Taktiež sa môže použiť podávanie testovanej látky v siedmy deň každého týždňa počas 35 dní. Počet párení nasledujúcich po ovplyvnení sa riadi harmonogramom ovplyvňovania a mal by zabezpečiť, že sa zachytia všetky štádiá zárodočných buniek. Na konci obdobia párenia sa samičky jednotlivo umiestnia do klietok. Keď samičky vrhnú, zaznamená sa dátum, veľkosť vrhu a pohlavie potomstva. Všetko samčie potomstvo sa odstaví a všetky samičie potomstvá sa odstránia, pokiaľ sa nepoužijú v pokuse.

Testovanie translokačnej heterozygozity

Používa sa jedna z dvoch možných metód:

— testovanie plodnosti $F_1$ potomstva a následné overenie možných nosičov translokácií pomocou cytogenetickej analýzy,

— cytogenetická analýza všetkých samčích $F_1$ potomkov bez predchádzajúcej selekcie testom plodnosti.

a) Testovanie plodnosti

Znížená plodnosť $F_1$ jedinca sa môže stanoviť pozorovaním veľkosti vrhu a/alebo analýzou obsahov maternice samičích krížencov.

Pre každý myší kmeň sa musia stanoviť kritériá pre určovanie normálnej a zníženej plodnosti.

*Pozorovanie veľkosti vrhu*: testovaní $F_1$ samci sa umiestnia jednotlivo do klietok so samičkami z toho istého pokusu alebo kolónie. Klietky sa prezerajú denne počnúc po 18. dňoch od párenia. Veľkosť vrhu a pohlavie $F_2$ potomstva sa zaznamená pri narodení a vrhy sú následne zničené. Ak sa testujú samičie $F_1$ potomstvá, $F_2$ potomstvá malých vrhov sa ponechajú pre ďalšie testovanie. Nosiči samičích translokácií sa overia cytogenetickou analýzou translokácie pre ich každého samčieho potomka. XO - samičky sa rozpoznajú prostredníctvom zmeny v pohlavnom pomere spomedzi ich potomstva od hodnoty 1: 1 na 1: 2 samcov *vs.* samíc. V nasledovnom kroku postupu sa $F_1$ zvieratá vylúčia z ďalšieho testovania v prípade, že prvý $F_2$ vrh dosiahne alebo prekročí predurčenú normálnu hodnotu. Inak sa pozoruje druhý alebo tretí $F_2$ vrh.

$F_1$ zvieratá, ktoré sa po pozorovaní až do tretieho vrhu nemôžu klasifikovať ako normálne, sa buď ďalej testujú analýzou obsahu maternice samičích krížencov, alebo sú priamo podrobené cytogenetickej analýze.

*Analýza maternicového obsahu*: Zníženie veľkosti vrhu nosičov translokácií je spôsobené odumretím embryí, takže vysoký počet mŕtvych implantátov naznačuje prítomnosť translokácií u testovaného zvieraťa. Každý testovaný samec $F_1$ sa pári s dvomi alebo tromi samicami. Počatie sa stanovuje denne ranným vyšetrením vaginálnej zátky. Samice sa usmrtia po uplynutí 14 až 16 dní a zaznamenajú sa žijúce a mŕtve implantáty, ktoré sa nachádzajú v ich maternici.

b) Cytogenetická analýza

Preparáty semenníkov sa vytvoria pomocou techniky sušenia na vzduchu. Nosiči translokácií sa určia pomocou prítomnosti multivalentných konfigurácií počas diakinézy metafázy I v primárnych spermatocytoch. Pozorovania aspoň dvoch buniek s multivalentnými vzťahmi sú základom požadovaného dôkazu, že testované zviera je nosičom translokácie.

Ak sa nevykonala selekcia vrhu, všetky samce $F_1$ sa vyšetria cytogeneticky. Mikroskopicky sa musí vyhodnotiť minimálne 25 buniek v štádiu diakinézy metafázy I na jedného samca. Pri samčekoch $F_1$ s malými semenníkmi a prerušením meiózy pred diakinézou alebo pri samičkách $F_1$ s podozrením na XO sa vyžaduje vyšetrenie mitotických metafáz v spermatogóniách alebo kostnej dreni. Prítomnosť nezvyčajne dlhého a/alebo krátkeho chromozómu v každej z 10 buniek je dôkazom určitej translokácie samčej sterility (c-t typ). Niektoré translokácie X - autozómu, ktoré spôsobujú samčiu sterilitu, sa dajú identifikovať iba prúžkovacou analýzou mitotických chromozómov. Prítomnosť 39 chromozómov vo všetkých 10 mitózach je dôkazom pre XO stav samice.

## 2. ÚDAJE

Údaje sa prezentujú vo forme tabuliek.

Pre každé obdobie párenia sa zaznamená priemerná veľkosť vrhu a pomer pohlaví z krížení rodičov pri narodení a pri odstavení.

Na potvrdenie plodnosti zvierat $F_1$ generácie sa uvádza priemerná veľkosť vrhu všetkých normálnych párení a veľkosť každého jednotlivého vrhu nosičov translokácie $F_1$. Na analýzu obsahu maternice sa uvádza priemerný počet žijúcich a mŕtvych implantátov pri normálnych páreniach a jednotlivé počty žijúcich a mŕtvych implantátov pri každom párení nosičov $F_1$ translokácie.

Na cytogenetickú analýzu diakinézy metafázy I sa pre každého nosiča translokácie uvádza počet typov multivalentných konfigurácií a celkový počet buniek.

Pre sterilných $F_1$ jedincov sa uvádza celkový počet párení a trvanie obdobia párenia. Uvedená je hmotnosť semenníkov a podrobnosti cytogenetickej analýzy.

Pre XO samice je uvedená priemerná veľkosť vrhu, pomer pohlaví v $F_2$ potomstve a výsledky cytogenetickej analýzy.

Ak je to možné, nosiči $F_1$ translokácií sa vopred selektujú testmi plodnosti. Tabuľky musia zahŕňať informácie o tom, pri koľkých z nich sa potvrdila translokačná heterozygozita.

Uvádzané sú údaje z experimentov s negatívnou a pozitívnou kontrolou.

## 3. SPRÁVA

### 3.1. Správa z testu

V prípade, že je to možné, správa z testu obsahuje tieto informácie:

— kmeň myší, vek zvierat, hmotnosť ovplyvnených zvierat,

— počet rodičovských zvierat každého pohlavia v experimentálnej a kontrolnej skupine,

— podmienky testu, podrobný opis ovplyvnenia, úrovne dávok, rozpúšťadlá, harmonogram párenia,

— počet a pohlavie potomkov na samicu, počet a pohlavie potomkov zobraných na analýzu translokácie,

— čas a kritériá analýzy translokácie,

— ak je to možné, počet a podrobný opis nosičov translokácie zahŕňajúci údaje o chove a údaje o obsahu maternice,

— cytogenetické metódy a podrobnosti o mikroskopickej analýze, pokiaľ možno s obrázkami,

— štatistické vyhodnotenie,

— diskusiu o výsledkoch,

— interpretáciu výsledkov.

### 3.2. Vyhodnotenie a interpretácia

Pozri všeobecný úvod časť B.

## 4. LITERATÚRA

Pozri všeobecný úvod časť B.

## ČASŤ C: METÓDY NA URČOVANIE EKOTOXICITY

### VŠEOBECNÝ ÚVOD: ČASŤ C

Nižšie opísané testovacie metódy sú na určovanie niektorých z ekotoxikologických vlastností uvedených v dodatku VIII k nariadeniu 79/831/EHS. Žiadatelia si musia byť vedomí toho, že v texte nie sú obsiahnuté metódy na určovanie nasledovných vlastností predpokladaných v časti 1 dodatku VIII:

— štúdium predĺženej toxicity *Daphnia magna,*

— test na vyššej rastline,

— štúdium predĺženej toxicity u rýb,

— test na hromadenie druhov.

Po vypracovaní vhodných testovacích metód na určovanie týchto vlastností, budú tieto metódy uverejnené vo forme ďalšieho prispôsobenia technickému pokroku. Dovtedy by žiadatelia mali používať vhodné medzinárodne uznávané metódy, ktoré musia byť predložené príslušnej osobe.

TEST INHIBÍCIE NA RIASACH

1. **METÓDA**

1.1. **Úvod**

Cieľom tohto testu je určiť vplyvy látky na rast druhov jednobunkových zelených rias. Relatívne jednoduché testy môžu stanoviť vplyvy na niekoľko generácií. Táto metóda sa môže prispôsobiť na použitie s rôznymi druhmi jednobunkových rias, v prípade ktorých spolu so správou o teste sa musí poskytnúť aj opis použitej metódy.

Táto metóda je najľahšie aplikovateľná na vo vode rozpustné látky, ktoré vzhľadom na podmienky testu pravdepodobne vydržia vo vode.

Pre látky s obmedzenou rozpustnosťou v testovacom médiu sa nemusí dať kvantitatívne určiť $EC_{50}$ (pozri nižšie uvedené definície).

Táto metóda sa môže použiť pre látky, ktoré priamo neovplyvňujú meranie rastu rias.

Pri vykonaní testu môžu byť užitočné tieto informácie:

— vodná rozpustnosť,

— tlak pary,

— štrukturálny vzorec,

— čistota látky,

— chemická stabilita vo vode a na svetle,

— metódy analýzy pre kvantifikáciu látky vo vode,

— $pK_a$ hodnota,

— koeficient pomeru n-oktanol/voda,

— výsledky hotového testu schopnosti biodegradácie.

1.2. **Definície a jednotky**

Koncentrácia buniek: počet buniek na mililiter;

Rast: zvýšenie koncentrácie buniek počas testovacieho obdobia;

Rýchlosť rastu: zvýšenie koncentrácie buniek vzhľadom na jednotku času;

$EC_{50}$: v tejto metóde predstavuje takú koncentráciu testovanej látky, ktorá vedie k 50 % zníženiu buď rastu, alebo rýchlosti rastu vzhľadom na kontrolu.

NOEC (žiaden pozorovaný vplyv koncentrácie): je v tejto metóde najvyššia testovaná koncentrácia, pre ktorú meraný parameter (-tre) vykazuje (-jú) nepodstatnú inhibíciu rastu vzhľadom na kontrolné hodnoty.

1.3. **Referenčné látky**

Referenčné látky môžu byť testované ako prostriedok určovania neuspokojivých podmienok testovania. Ak je použitá referenčná látka, výsledky sa majú uviesť v správe o teste. Ako referenčná látka sa môže použiť dichróman draselný.

1.4. **Princíp testovacej metódy**

Exponenciálne rastúce kultúry vybraných zelených rias sa počas niekoľkých generácii, za určených podmienok, vystavia rôznym koncentráciám testovanej látky. Inhibícia rastu vzhľadom na kontrolnú kultúru sa určuje počas fixnej periódy.

1.5. **Kritériá kvality**

1.5.1. *Podmienky platnosti testu*

Koncentrácia buniek v kontrolných kultúrach sa má zvyšovať aspoň 16 - násobne počas troch dní.

Vymiznutie testovanej látky z vody smerom do biomasy nemusí nevyhnutne znehodnocovať test.

1.6. **Opis testovacieho postupu**

1.6.1. *Príprava*

1.6.1.1. Vybavenie a materiály

— normálne laboratórne vybavenie,

— testovacie banky vhodného objemu (napr. 250 ml kónické banky sú vhodné v prípade, keď objem testovaného roztoku je 100 ml),

— kultivačná aparatúra: box alebo komora, v ktorej sa môže teplota udržiavať v rozsahu od 21 do 25 ± 2 °C a rovnomerné súvislé osvetlenie v spektrálnom rozsahu od 400 do 700 nm. (Odporučený je kvantový tok 0,72 x $10^{20}$ fotónov/$m^2$s s toleranciou ± 20 %. Takýto kvantový tok sa rovná 120 µE/$m^2$s a môže sa získať pomocou univerzálnej bielej flourescenčnej lampy (teplota svetla okolo 4 200 K) s výkonom približne 8 000 luxov meraným kruhovým kolektorom).

— Aparatúra na určenie koncentrácie buniek, napr. elektrónový počítač častíc, mikroskop s počítacou komôrkou, fluorometer, spektrofotometer, kolorimeter (*Poznámka*: na poskytnutie zmysluplných meraní použitím spektrofotometra pri nízkych bunkových koncentráciách sa môže ukázať ako nevyhnutné aj použitie kyviet so svetlou dráhou aspoň 4 cm).

1.6.1.2. Riasové médium

Doporučené je nasledujúce médium:

| | | |
|---|---|---|
| $NH_4Cl$: | 15 | mg/l, |
| $MgCl_2$. $6H_2O$: | 12 | mg/l, |
| $CaCl_2$. $2H_2O$: | 18 | mg/l, |
| $MgSO_4$. $7H_2O$: | 15 | mg/l, |
| $KH_2PO_4$: | 1,6 | mg/l, |
| $FeCl_3$. $6H_2O$: | 0,08 | mg/l, |
| $Na_2EDTA$. $2H_2O$: | 0,1 | mg/l, |
| $H_3BO_3$: | 0,185 | mg/l, |
| $MnCl_2$. $4H_2O$: | 0,415 | mg/l, |
| $ZnCl_2$: | $3 \times 10^{-3}$ | mg/l, |
| $CoCl_2$. $6H_2O$: | $1,5 \times 10^{-3}$ | mg/l, |
| $CuCl_2$. $2H_2O$: | $10_5^-$ | mg/l, |
| $NaMoO_4$. $2H_2O$: | $7 \times 10^{-3}$ | mg/l, |
| $NaHCO_3$: | 50 | mg/l, |

Po vyrovnaní so vzduchom je pH tohto média približne 8.

V súvislosti s vyššie uvedeným odporučením nie je vopred vylúčené použitie iného prostredia, musia sa však rešpektovať nasledujúce obmedzenia:

| | |
|---|---|
| P: | ≤ 0,7 mg/l, |
| N: | ≤ 10 mg/l, |
| chelátory: | ≤ $10^{-3}$ mmol/l, |
| tvrdosť (Ca + Mg) | ≤ 0,6 mmol/l, |

Odporúčané médium a médium opísané v odkaze (1) spĺňajú túto požiadavku.

1.6.1.3. Pokusné organizmy

Výber druhov

Odporúča sa, aby použité druhy zelených rias boli rýchlo rastúcimi druhmi, takže sú vhodné pre kultiváciu a testovanie. Ako vhodné sa považujú tieto druhy:

— *Selenastrum capricornutum* ATCC 22662,

— *Scenedesmus subspicatus* 86.81 SAG,

— *Chlorella vulgaris* CCAP 211/11b.

V prípade, že sú použité iné druhy, mal by sa uviesť kmeň.

1.6.1.4. Návrh testu

Počiatočná bunková koncentrácia

Doporučené je, aby počiatočná koncentrácia buniek v testovaných kultúrach bola približne $10^4$ buniek/ml v prípade *Selenastrum capricornutum* a *Scenedesmus subspicatus*. V prípade použitia iných druhov by mala byť biomasa porovnateľná.

Koncentrácia testovanej látky

Rozsah koncentrácie, v ktorom sa pravdepodobne prejavia efekty, sa stanoví na základe výsledkov testov na hľadanie rozsahu. Pre tento test sa musí vybrať aspoň päť koncentrácii usporiadaných do geometrického radu. Najnižšia testovaná koncentrácia nesmie mať pozorovateľný efekt na rast rias. Najvyššia testovaná koncentrácia by mala inhibovať rast aspoň 50 % vzhľadom na kontrolu a v lepšom prípade úplne zastaviť rast.

Opakovania a kontroly

Vo vhodnom prípade by návrh testu mal obsahovať tri opakovania pre každú testovanú koncentráciu a v ideálnom prípade dvojnásobok počtu kontrol. V odôvodnenom prípade sa návrh testu môže upraviť k zvýšeniu počtu koncentrácii a zníženiu počtu opakovaní pre jednu koncentráciu.

V prípade, že je použitý nosič na rozpustenie testovanej látky, mali by sa v návrhu testu doplniť dodatočné kontroly obsahujúce nosič v najvyšších koncentráciách v testovacích kultúrach.

1.6.2. *Uskutočnenie testu*

Táto časť obsahuje poučenie pre testovanie ľahko a ťažko rozpustných látok a nestálych látok.

1.6.2.1. Testovanie vo vode ľahko rozpustných látok

Testované kultúry, ktoré obsahujú želané koncentrácie testovanej látky a želané množstvo inokúl rias, sa pripravujú riedením s filtrovaným riasovým médiom, pomerným množstvom zásobných roztokov testovanej látky a suspenziou rias.

Kultivačné banky sa pretrepú a umiestnia do kultivačného aparátu. Počas testu je nevyhnutné udržiavať riasy v suspenzii a uľahčovať prenos $CO_2$. Na dosiahnutie tohto cieľa sa môže použiť pretrepávanie, premiešavanie alebo prevzdušňovanie. Kultúry by sa mali udržiavať pri teplote v rozsahu 21 až 25 °C riadenej na ± 2 °C.

Bunková koncentrácia v každej banke sa určuje aspoň každých 24, 48 a 72 hodín po začatí testu. Filtrované riasové médium sa využije na určovanie pozadia v prípade použitia časticových počítačov alebo ako čistý základ pri spektrofotometroch.

Na začiatku testu a po 72 hodinách sa určí pH.

Za normálnych okolností by sa počas testu nemalo pH roztokov odchyľovať o viac ako jednotku.

1.6.2.2. Testovanie látok s obmedzenou rozpustnosťou vo vode

V prípade, že rozpustnosť testovanej látky je rádovo porovnateľná s najvyššou koncentráciou použitou v teste, na prípravu testovacích roztokov sú nevyhnutné iba drobné odchýlky oproti vyššie uvedenému postupu. Nasýtený roztok môže slúžiť ako zásobný roztok testovanej látky. Iný prístup môže spočívať v rozpustení testovanej látky v želanej koncentrácii v riasovom médiu ešte pred zavedením suspenzie rias.

Zásobné roztoky vo vode ťažko rozpustných látok sa môžu pripraviť mechanickým rozptyľovaním alebo použitím nosičov s nízkou toxicitou voči riasam ako napr. organické rozpúšťadlá, emulzifikátory alebo disperzanty. V prípade použitia nosiča, nesmie koncentrácia presiahnuť 100 mg/liter a v návrhu testu musia byť zahrnuté dodatočné kontroly, v ktorých je začlenený nosič v najvyššej koncentrácii prítomnej v testovacích roztokoch.

1.6.2.3. Testovanie nestálych látok

V súčasnosti nie je všeobecne uznávaný spôsob testovania nestálych látok. Ak je známe, že látka má sklon k vyprchávaniu, môžu sa použiť uzavreté testovacie banky s rozšírenou hlavicou. Navrhnuté boli obmeny tejto metódy [pozri odkaz (1)].

Vykonať by sa mali pokusy na určenie množstva látky, ktorá ostáva v roztoku a doporučuje sa dať vysoký pozor pri interpretácii výsledkov testov s nestálymi chemikáliami za použitia uzavretých systémov.

## 2. ÚDAJE A VYHODNOTENIE

Namerané koncentrácie buniek v testovaných kultúrach sú tabelované spolu s koncentráciami testovanej látky a časmi meraní. Na vytvorenie rastových kriviek sa v závislosti od času vykreslí stredná hodnota bunkovej koncentrácie pre každú koncentráciu testovanej látky a kontrol.

Nasledujúce dva prístupy by sa mali použiť na určenie vzťahu koncentrácia/efekt.

2.1. **Porovnanie plôch pod rastovou krivkou**

Plocha pod rastovými krivkami sa môže vypočítať podľa vzorca:

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

kde:

$A$ = plocha,

$N_0$ = nominálny počet buniek/ml v čase $t_0$,

$N_1$ = nameraný počet buniek/ml v čase $t_1$,

$N_n$ = nameraný počet buniek/ml v čase $t_n$,

$t_1$ = čas prvého merania po začiatku testu,

$t_n$ = čas *n*-tého merania po začiatku testu.

Percentuálna inhibícia bunkového rastu v každej koncentrácii testovanej látky ($I_A$) je vypočítaná ako rozdiel medzi plochou pod rastovou krivkou kontroly ($A_C$) a plochy pod rastovou krivkou v každej koncentrácii ($A_t$) testovanej látky:

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

Hodnoty $I_A$ sú vykreslené na semilogaritmickom papieri alebo na semilogaritmickom štatistickom papieri vzhľadom na zodpovedajúce koncentrácie. V prípade zobrazovania na štatistickom papieri bodmi od oka prekladáme priamku. Ak sa predpokladá log-normálne rozdelenie hodnôt, znázornená je vypočítaná regresná priamka.

Hodnota $EC_{50}$ sa dostane z posunu (regresnej) priamky od rovnobežky k úsečky v $I_A$ = 50 %. Vo vzťahu k metóde výpočtu sa na jednoznačné vyjadrenie tejto hodnoty navrhuje použiť symbol $E_bC_{50}$. V súvislosti s touto metódou, ktorá špecifikuje merania v 24, 48 a 72 hodinách, symbol má zápis $E_bC_{50}$ (0 - 72 h).

Iné hodnoty EC ako napr. $E_bC_{10}$ sa môžu vyvodiť z grafu $I_A$ *versus* logaritmus koncentrácie.

2.2. **Porovnanie rýchlostí rastu**

Priemerná špecifická rýchlosť rastu ($\mu$) pre exponenciálne rastúce kultúry sa vypočíta ako:

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

Priemerná špecifická rýchlosť rastu sa môže eventuálne odvodiť zo sklonu regresnej priamky v grafe závislosti ln N *versus* čas.

Percentuálna redukcia priemernej špecifickej rýchlosti rastu pre každú koncentráciu testovanej látky porovnávaná s kontrolnou hodnotou sa zobrazí vzhľadom na logaritmus koncentrácie. Ich hodnota $EC_{50}$ sa môže vyčítať z výsledného grafu. Na jednoznačné vyjadrenie $EC_{50}$ odvodenou touto metódou sa navrhuje použiť symbol $E_rC_{50}$. Časy meraní sa musia vyznačiť, napr. ak sa hodnota vzťahuje na časy 24 a 48 hodín, symbol má zápis $E_rC_{50}$ (24 - 48 hod.)

*Poznámka:* špecifická rýchlosť rastu je logaritmický termín a malé zmeny v rýchlosti rastu môžu mať za následok veľké zmeny v biomase. Hodnoty $E_bC$ a $E_rC$ nie sú preto numericky porovnateľné.

3. **SPRÁVA**

Ak je to možné, správa z testu obsahuje:

— testovanú látku: chemické identifikačné dáta,

— testované organizmy: pôvod, laboratórna kultúra, počet kmeňov, metódu kultivácie,

— podmienky testu:

  — dátum začiatku a ukončenia testu a jeho trvanie,

  — teplotu,

  — zloženie média,

— kultivačný prístroj,

— pH roztokov na začiatku a na konci testu (v prípade, že odchýlky pH sú viac ako jednotka, tak by sa malo poskytnúť vysvetlenie),

— nosič a metóda použitá na rozpúšťanie testovanej látky a koncentrácie nosiča v testovaných roztokoch,

— intenzita a kvalita svetla,

— testované koncentrácie (merané alebo nominálne).

— Výsledky:

— koncentrácia buniek v každej banke v každom kroku merania a metódu na stanovenie koncentrácie buniek,

— stredné hodnoty koncentrácií buniek,

— rastové krivky,

— grafické znázornenie závislosti efektu koncentrácie,

— hodnoty EC a metódu výpočtu,

— NOEC,

— iné pozorované účinky.

4. **LITERATÚRA**

(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 Grűnalge *Scenedesmus subspicatus*", in: Rudolph/Boje: *Őkotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

*Dodatok*

## PRÍKLAD PROCEDÚRY NA KULTIVÁCIU RIAS

### Všeobecné pozorovania

Cieľom kultivácie založenej na nasledovnom postupe je získať kultúry rias na účely testov toxicity.

Na to, aby sa kultúry rias neinfikovali baktériami (ISO 4833), mali by sa použiť vhodné metódy. Axenické kultúry môžu byť vhodné, hoci najdôležitejšie sú kultúry získané z jedného druhu rias.

Všetky operácie sa môžu vykonávať v sterilných podmienkach z cieľom predísť kontaminácii baktériami a inými riasami.

### Vybavenie a materiály

Pozri pod časťou 1.6.1: Príprava a experimentálne organizmy.

### Postupy pri získavaní kultúr rias

*Prípravy nutričných roztokov (média)*

Všetky nutričné soli média sa pripravujú ako koncentrované zásobné roztoky a uchovávajú sa v tme a chlade. Takéto roztoky sa sterilizujú filtráciou a autoklávovaním.

Médium sa pripravuje pridávaním správnych množstiev zásobných roztokov do sterilnej destilovanej vody so zreteľom na to, aby nenastala infekcia. Pre tuhé médium pridávame 0,8 % agaru.

*Zásobná kultúra*

Zásobné kultúry sú malé kultúry rias, ktoré sa pravidelne prenášajú do čerstvého média s cieľom počiatočného testu materiálu. Ak kultúry sa nepoužívajú pravidelne, naočkujú sa na šikmú živnú pôdu v skúmavkách. Aspoň raz za dva mesiace sa prenášajú do čistého prostredia.

Zásobné kultúry sa nechajú vyrásť v kónických bankách obsahujúcich vhodné médium (objem približne 100ml). Týždenné prenášanie sa vyžaduje v prípade, že sa riasy inkubujú na 20 °C so súvislým osvetlením.

Počas prenosu je isté množstvo„starej“ kultúry prenesené pomocou sterilných pipiet do nádoby s čerstvým médiom tak, aby počiatočná koncentrácia rýchlo rastúceho druhu bola zhruba 100 - krát menšia ako koncentrácia v starej kultúre.

Rýchlosť rastu druhu sa môže určiť z rastovej krivky. Ak je táto krivka známa, je možné odhadnúť hustotu, pri ktorej sa musí kultúra preniesť do nového média. Musí sa to uskutočniť predtým, ako kultúra dosiahne fázu umierania.

*Predkultúra*

Predkultúra má za úlohu poskytnúť množstvo rias vhodných pre naočkovanie testovacích kultúr. Predkultúra sa inkubuje za podmienok testu a využíva sa v období exponenciálneho rastu, bežne po zhruba troch dňoch inkubácie. Ak kultúry rias obsahujú porušené alebo abnormálne bunky, musia sa zničiť.

TOXICITA NA DÁŽĎOVKÁCH

UMELOPÔDNY TEST

## 1. METÓDA

### 1.1. Úvod

V tomto laboratórnom teste sa testovaná látka pridáva do umelej pôdy, v ktorej sú po dobu 14 dní umiestnené dážďovky. Po tomto čase (alternatívne po 7 dňoch) sa zisťuje letálny efekt testovanej látky na dážďovky. Test poskytuje metódu na relatívne krátkodobé sledovanie účinku chemických látok na dážďovky cez príjem pokožkou a tráviacim traktom.

### 1.2. Definície a jednotky

$LC_{50}$: Koncentrácia testovanej látky, ktorá usmrtí 50 % testovacích organizmov počas doby experimentu.

### 1.3. Referenčná látka

Referenčná látka sa periodicky používa na preukázanie, že citlivosť testovacieho systému sa významne nezmenila.

Ako referenčná látka sa oporúča chloroacetamid analytickej čistoty.

### 1.4. Princíp testovacej metódy

Pôda je variabilné médium, a preto sa v tomto teste používa presne definovaná ílovitá umelá pôda. Dospelé dážďovky druhu *Eisenia foetida* (pozri poznámku v dodatku) sú uchovávané v definovanej umelej pôde v prítomnosti rôznych koncentrácií testovanej látky. Obsah nádoby sa po 14 dňoch (alternatívne po 7 dňoch) od začiatku testu vysype na tácku a pre každú testovanú koncentráciu sa počíta množstvo prežívajúcich dážďoviek

### 1.5. Kritériá kvality

Test je navrhnutý tak, aby bol v maximálnej miere reprodukovateľný vzhľadom na použitú testovanú látku a organizmus. Mortalita v kontrole nesmie presiahnuť na konci testu 10 %, v opačnom prípadne je test neplatný.

### 1.6. Opis testovacej metódy

#### 1.6.1. *Materiál*

##### 1.6.1.1. Testovací substrát

Ako základný substrát je používaná presne definovaná umelá pôda.

a) Základný substrát (percentá sú uvedené pre sušinu)

— 10 % rašeliny (pH čo najbližšie k 5,5 - 6,0, bez viditeľných rastlinných zvyškov a jemne rozdrvená),

— 20 % kaolínovej hliny s obsahom kaolínu prednostne vyšším ako 50 %,

— približne 69 % priemyselného kremenného piesku (prevažne jemný piesok, kde viac ako 50 % častíc má veľkosť 0,05 až 0,2 mm). Ak látka nie je dostatočne dispergovateľná vo vode, 10 g látky na jednu testovaciu nádobu by malo byť ponechané na dodatočné zmiešanie s testovanou látkou,

— približne 1 % uhličitanu vápenatého ($CaCO_3$), práškový, chemicky čistý, pridávaný na vyrovnanie pH k 6,0 ± 0,5.

b) Testovací substrát

Testovací substrát obsahuje základný substrát, testovanú látku a deionizovanú vodu.

Obsah vody je približne 25 až 42 % sušiny základného substrátu. Obsah vody v substráte sa určuje vysušením vzorky na konštantnú hmotnosť pri teplote 105 °C. Kľúčovým kritériom vlhkosti umelej pôdy je neprítomnosť stojacej vody. Pozorne treba dohliadnuť na rovnomerné premiešanie testovanej látky a substrátu. Spôsob zapracovania testovanej látky do substrátu musí byť uvedený.

c) Kontrolný substrát

Kontrolný substrát obsahuje základný substrát a vodu. Ak je použitá nejaká aditívna látka, dodatočná kontrola by mala obsahovať rovnaké množstvo tejto aditívnej látky.

1.6.1.2. Testovacie nádoby

Testovacími nádobami sú sklenené nádoby s objemom približne 1 liter (primerane zakryté plastovými vrchnákmi, miskami alebo fóliou s vetracími otvormi) naplnené testovacím alebo kontrolným substrátom, ktorý zodpovedá 500 g sušiny substrátu.

1.6.2. *Podmienky testu*

Nádoby by mali byť uskladnené v klimatizovaných miestnostiach pri teplote 20 ± 2°C a pri stálom osvetlení. Intenzita svetla sa odporúča 400 - 800 luxov.

Doba experimentu je 14 dní, ale mortalita môže byť alternatívne hodnotená po 7 dňoch od začatia testu.

1.6.3. *Postup testu*

Testovacie koncentrácie

Koncentrácie testovanej látky sú vyjadrené ako hmotnosť látky na hmotnosť sušiny základného substrátu (mg/kg).

Test na vyhľadávanie rozsahu

Rozpätie koncentrácií spôsobujúcich mortalitu od 0 do 100 % môže byť stanovené v teste na vyhľadávanie rozsahu, pri ktorom sa získajú informácie o tom, ktoré koncentrácie sa použijú v konečnom teste.

Látka by mala byť testovaná v nasledovných koncentráciách: 1 000; 100; 10; 1; 0,1mg látky/kilogram testovacieho substrátu (sušiny).

Ak sa uskutočňuje konečný test v plnom rozsahu, v teste na vyhľadávanie rozsahu by mala byť dostačujúca jedna testovacia skupina na koncentráciu a jedna neovplyvnená kontrola, každá po 10 jedincov.

Konečný test

Výsledky testu na vyhľadávanie rozsahu sa použijú na výber najmenej 5 koncentrácií v geometrickom rade tak, aby pokrývali rozpätie mortality 0 až 100 % a odlišujúcich sa od seba konštantným faktorom nepresahujúcim hodnotu 1,8.

Testy s použitím týchto koncentrácií by mali umožniť čo najpresnejšie stanovenie koncentrácie $LC_{50}$ a jej hranice významnosti.

V konečnom teste sú zahrnuté najmenej 4 testované skupiny na koncentráciu a 4 neovplyvnené kontroly, každá po 10 jedincov. Výsledky v paralelných skupinách sa uvádzajú ako priemer a smerodajná odchýlka.

Ak dve následné koncentrácie v pomere 1,8, dávajú iba 0 a 100 % mortalitu, sú tieto dve hodnoty dostačujúce na indikovanie rozpätia, do ktorého spadá hodnota $LC_{50}$.

Zmes základného testovacieho substrátu a testovanej látky

Testovací substrát by podľa možnosti mal byť pripravený bez akýchkoľvek prísad iných ako voda. Bezprostredne pred začatím testu sa emulzia alebo disperzia testovanej látky v deionizovanej vode alebo inom rozpúšťadle zmieša so základným testovacím substrátom, alebo je na substrát rovnomerne nastriekaná jemným chromatografickým alebo podobným sprejom.

Ak je testovaná látka nerozpustná vo vode, môže byť rozpustená v čo najmenšom objeme vhodného organického rozpúšťadla (napr. hexán, acetón alebo chloroform).

Na rozpustenie, dispergovanie alebo emulgovanie testovanej látky môžu byť použité len činidlá, ktoré sú ľahko prchavé. Testovací substrát musí byť pred použitím prevzdušnený. Množstvo vyparenej vody treba nahradiť. Kontrola by mala obsahovať rovnaké množstvo akejkoľvek aditívnej látky.

Ak testovaná látka nie je rozpustná, dispergovateľná alebo emulgovateľná v organickom rozpúšťadle, je potrebné zmiešať 10 g zmesi jemne rozdrveného kremenného piesku a testovanej látky v množstve potrebnom na ovplyvnenie 500 g sušiny umelej pôdy so 490 g sušiny testovacieho substrátu.

Pre každú testovaciu skupinu sa do sklenenej nádoby umiestni vlhký testovací substrát v množstve 500 g sušiny a na povrch substrátu sa uloží 10 dážďoviek, ktoré boli 24 hodín pred pokusom vystavené podmienkam podobným vlhkému základnému substrátu a následne umyté a prebytočná voda odsatá filtračným papierom.

Aby sa zabránilo vysychaniu substrátu, nádoby sú zakryté perforovanými plastovými vrchnákmi, miskami alebo fóliou a v týchto testovacích podmienkach sú uchovávané 14 dní.

Hodnotenie by sa malo uskutočňovať 14 dní (alternatívne 7 dní) po začatí experimentu. Substrát sa rozvrství na sklenenú platňu alebo platňu z nehrdzavejúcej ocele. Pozorujú sa dážďovky a počíta sa množstvo prežívajúcich jedincov. Dážďovka sa považuje za mŕtvu, ak nereaguje na jemný mechanický podnet v prednej časti tela.

Ak sa vyhodnotenie robí na 7. deň, nádoby sa opätovne naplnia substrátom a prežívajúce dážďovky sa umiestnia na povrch toho istého testovacieho substrátu.

1.6.4. *Testovacie organizmy*

Testovacími organizmami sú dospelé jedince druhu *Eisenia foetida* (pozri dodatok) (najmenej 2 mesiace straré s vyvinutým klitelom) s hmotnosťou 300 až 600 mg vo vlhkom stave. (Metóda chovu, pozri dodatok).

2. **ÚDAJE**

2.1. **Spracovanie a vyhodnotenie výsledkov**

Koncentrácie testovanej látky sa vyjadrujú vo vzťahu k príslušným percentám odumretých jedincov.

Ak sú údaje adekvátne, hodnota $LC_{50}$ a hranice významnosti (p = 0,05) sa určujú štandardnými metódami (Litchfield a Wilcoxon, 1949, pre ekvivalentnú metódu). Hodnota $LC_{50}$ sa udáva v mg testovanej látky na kilogram testovacieho substrátu (sušina).

V prípadoch, keď je sklon koncentračnej krivky príliš strmý na prepočet hodnoty $LC_{50}$, postačuje grafický odhad tejto hodnoty.

Ak dve následné koncentrácie v pomere 1,8, dávajú iba 0 a 100 % mortalitu, sú tieto dve hodnoty dostačujúce na indikovanie rozpätia, do ktorého spadá hodnota $LC_{50}$.

3. **SPRÁVA**

3.1. **Správa z testu**

Správa z testu obsahuje podľa možnosti tieto informácie:

— prehlásenie, že test bol uskutočnený v súlade s vyššie uvedenými kritériami kvality,

— uskutočnený test (test na vyhľadávanie rozsahu a/alebo konečný test),

— presný opis testovacích podmienok a prehlásenie, že test bol prevedený v súlade s metódou; akákoľvek odchýlka musí byť uvedená,

— presný opis zmiešania testovacej látky so základným substrátom,

— informáciu o testovacích organizmoch (druh, vek, priemer a rozpätie hmotnosti, podmienky udržiavania a chovu, dodávateľ),

— metódu použitá na určenie hodnoty $LC_{50,}$

— výsledky, vrátane všetkých použitých údajov,

— opis pozorovaných prejavov alebo zmien správania testovacích organizmov,

— mortalita v kontrolách,

— hodnotu $LC_{50}$ alebo najvyššiu testovanú koncentráciu bez mortality a najnižšiu testovanú koncentráciu s mortalitou 100 % 14 dní (alternatívne 7 dní) po začatí experimentu,

— znázornenie koncentračnej krivky/krivky opovede,

— výsledky získané použitím referenčnej látky, buď v spojení s prezentovaným testom, alebo z predchádzajúcej kontroly kvality.

4. **LITERATÚRA**

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

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

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

(4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluation dose effect experiments. *J. Pharm. Exp. Therap.*, vol. 96, 1949, s. 99.

(5) Commission of the European Communities, *Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms*, Report EUR 8714 EN, 1983.

(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt fűr Land- and Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in kűnstlichem Boden", in: Rudolph/Boje, *Őkotoxikologie*, ecomed, Landsberg, 1986.

*Dodatok*

**Chov a udržiavanie dážďoviek pred testom**

Na chov dážďoviek sa používa chovná nádoba s čerstvým substrátom, do ktorej sa na 14 dní umiestni 30 až 50 dospelých jedincov. Tieto jedince sa potom môžu použiť na ďalšie chovné sady. Dážďovky vyliahnuté z kokónov sa po dosiahnutí dospelosti používajú na testovanie (pri uvedených podmienkach je to po 2 až 3 mesiacoch).

**Podmienky udržiavania a chovu**

| | |
|---|---|
| Klimatizovaná miestnosť: | teplota 20 ± 2°C, prednostne s kontinuálnym osvetlením (intenzita 400 - 800 luxov). |
| Chovné nádoby: | primerané plytké nádoby s objemom 10 až 20 litrov. |
| Substrát: | *Eisenia foetida* sa môže pestovať v rôznych živočíšnych exkrementoch. Ako chovné médium sa doporučuje zmes 50 % rašeliny a 50 % kravského alebo konského hnoja. Médium by malo mať pH približne 6 až 7 (regulované prídavkom ulhičitanu vápenatého) a nízku iónovú vodivosť (menej ako 6 mmhos alebo 0,5 % solí).<br><br>Substrát by mal byť vlhký, ale nie príliš mokrý.<br><br>Okrem vyššie uvedenej metódy sa môžu použiť aj iné úspešné postupy. |

*Poznámka: Eisenia foetida* sa vyskytuje v dvoch líniách, ktoré niektorí taxonomisti rozdelili do druhov (Bouche, 1972). Sú morfologicky podobné, ale *Eisenia foetida foetida* má typické priečne prúžkovanie na článkoch a *Eisenia foetida andrei* nemá uvedené prúžkovanie a má nepravidelné načervenalé zafarbenie. Podľa možnosti je vhodné použiť dážďovky *Eisenia foetida andrei*. Ak je k dispozícii potrebná metodika, môžu byť použité aj iné druhy.

BIODEGRADÁCIA

ZAHN - WELLENSOV TEST

## 1. METÓDA

### 1.1. Úvod

Účelom tejto metódy je hodnotenie potenciálnej konečnej biodegradovateľnosti vo vode rozpustných, neprchavých organických látok v stacionárnom teste pri vystavení vysokým koncentráciám mikroorganizmov.

Môže sa vyskytnúť fyzikálno - chemická adsorbcia na suspendované pevné látky, a preto ju treba brať do úvahy pri interpretácii výsledkov (pozri 3.2).

Študované látky sa používajú v koncentráciách zodpovedajúcich hodnotám DOC v rozmedzí 50 až 400 mg/liter alebo hodnotám COD v rozmedzí 100 až 1 000 mg/liter [DOC = dissolved organic carbon (rozpustený organický uhlík); COD = chemical oxygen demand (chemická spotreba kyslíka)]. Takéto relatívne vysoké koncentrácie majú výhodu analytickej spoľahlivosti. Zlúčeniny s toxickými vlastnosťami môžu oddialiť alebo inhibovať degradačný proces.

V tejto metóde sa na zistenie biodegradovateľnosti testovanej látky využíva meranie rozpusteného organického uhlíka a chemická spotreba kyslíka.

Súčasné použitie špecifickej analytickej metódy môže umožniť zhodnotenie primárnej biodegradácie látky (odstránenie pôvodnej chemickej štruktúry).

Metóda je aplikovateľná len na tie testované organické látky, ktoré pri koncentráciách použitých v teste vykazujú nasledujúceé vlastnosti:

— sú pri testovacích podmienkach rozpustné vo vode,

— pri testovacích podmienkach majú zanedbateľný tlak pár,

— nepôsobia inhibične na baktérie,

— v testovacom systéme sú adsorbované len v limitovanom množstve,

— z testovacieho roztoku sa nestrácajú penením.

Informácia o relatívnom pomere hlavných zložiek testovaného materiálu sa použije pri interpretácii získaných výsledkov, obzvlášť v prípadoch, kde sú výsledky slabé alebo okrajové.

Informácia o toxicite látky na mikroorganizmy je žiaduca pri interpretácii slabých výsledkov a pri výbere vhodných testovacích koncentrácií.

### 1.2. Definície a jednotky

Stupeň biodegradácie dosiahnutý na konci testu sa udáva ako „Biodegradovateľnosť v Zahn - Wellensovom teste“:

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

kde:

$D_T$ = biodegradácia (%) v čase T,

$C_A$ = DOC (alebo COD) hodnota v testovanej zmesi meraná 3 hodiny po začatí testu (mg/l) (DOC = rozpustený organický uhlík, COD = chemická spotreba kyslíka),

$C_T$ = DOC alebo COD hodnota testovanej zmesi v čase odberu vzorky (mg/l),

$C_B$ = DOC alebo COD hodnota slepého pokusu v čase odberu vzorky (mg/l),

$C_{BA}$ = DOC alebo COD hodnota slepého pokusu meraná 3 hodiny po začatí testu (mg/l).

Rozsah degradácie sa zaokrúhľuje na najbližšie celé percento.

Percentuálna degradácia sa stanovuje ako percento úbytku DOC (alebo COD) z testovanej látky.

Rozdiely medzi hodnotami nameranými po 3 hodinách od začatia tesu a prepočítanými alebo prednostne nameranými počiatočnými hodnotami poskytujú vhodnú informáciu o eliminácii látky (pozri 3.2, Interpretácia výsledkov).

1.3. **Referenčné látky**

V prípade skúmania novej testovanej látky je vhodné použiť referenčnú látku, avšak špecifickú referenčnú látku nie je zatiaľ možné odporučiť.

1.4. **Princíp testovacej metódy**

Aktivovaný kal, minerálne živiny a testovaný materiál ako jediný zdroj uhlíka vo vodnom roztoku sú spolu umiestnené do sklenenej nádoby s objemom 1 až 4 litre vybavenej miešadlom a prevzdušňovačom. Zmes sa premiešava a prevzdušňuje pri teplote 20 až 25 °C pod difúznym osvetlením alebo v tme po dobu 28 dní. Proces degradácie sa monitoruje vo filtrovanom roztoku stanovovaním hodnoty DOC (alebo COD) denne alebo v iných pravidelných časových intervaloch. Pomer eliminovaných DOC (alebo COD) v každom časovom intervale k hodnote získanej po 3 hodinách od začiatku testu sa vyjadruje ako percento biodegradácie a slúži na meranie rozsahu deradácie v danom čase. Výsledok je znázornený v biodegradačnej krivke v závislosti od času.

Pri použití špecifickej analytickej metódy sa môže merať zmena koncentrácie pôvodnej molekuly v dôsledku biodegradácie (primárna biodegradovateľnosť).

1.5. **Kritériá kvality**

Dostatočná reprodukovateľnosť tohto testu bola potvrdená kruhovým testom.

Citlivosť metódy je do značnej miery určená variabilitou slepej vzorky a v menšej miere presnosťou stanovenia hodnoty DOC a hladiny testovanej zlúčeniny v médiu.

1.6. **Opis testovacej metódy**

1.6.1. *Príprava*

1.6.1.1. Reagenčné látky

Testovacia voda: pitná voda s obsahom organického uhlíka menej ako 5 mg/liter. Koncentrácia iónov vápnika a horčíka nesmie spolu presiahnuť 2,7 mmol/liter; v opačnom prípade sa požaduje riedenie s deionizovanou alebo destilovanou vodou.

| | |
|---|---|
| Kyselina sírová, analytickej čistoty (p.a.): | 50 g/l. |
| Roztok hydroxidu sodného (p.a.): | 40 g/l. |
| Roztok minerálnych živín: rozpustiť v 1 litri deionizovanej vody: | |
| - chlorid amónny, $NH_4Cl$, (p.a.): | 38,5 g, |
| - dihydrogénfosforečnan sodný, $NaH_2PO_4.2H_2O$, (p.a.): | 33,4 g, |
| - dihydrogénfosforečnan draselný, $KH_2PO_4$, (p.a.): | 8,5 g, |
| - hydrogénfosforečnan draselný, $K_2HPO_4$, (p.a.): | 21,75 g. |

Zmes slúži jednak ako zdroj živín aj ako tlmivý roztok.

1.6.1.2. Prístroje

Sklenené nádoby s objemom 1 až 4 litre (napr. cylindrické nádoby).

Miešadlo so skleneným alebo kovovým rotorom na vhodnom pieste (miešadlo by malo rotovať približne 5 až 10 cm nad dnom nádoby). Namiesto takéhoto miešadla môže byť použitý aj magnetický rotor s miešadlom dlhým 7 až 10 cm.

Sklená trubka s vnútorným priemerom 2 až 4 mm na vháňanie vzduchu. Koniec trubky s otvorom by mal byť približne 1 cm nad dnom nádoby.

Centrifúga (približne 3 550g).

pH meter.

Prístroj na meranie rozpusteného kyslíka.

Papierové filtre.

Membránová filtračná aparatúra.

Membránové filtre s pórmi o veľkosti 0,45 μm. Vhodné sú membránové filtre, ktoré neumožňujú únik uhlíka ani absorpciu látky počas filtrácie.

Analytické zariadenie na stanovenie obsahu organického uhlíka a chemickej spotreby kyslíka.

1.6.1.3. Príprava inokula

Aktivovaný kal z biologickej čističky sa premýva (opakovanou) centrifugáciou alebo sedimentovaním s testovacou vodou.

Aktivovaný kal musí byť vo vhodnom stave. Takýto kal je dostupný zo správne pracujúcej čističky odpadových vôd. Aby sa získal čo najväčší počet rôznych druhov bakteriálnych kmeňov, uprednostňuje sa zmiešať inokulá z rôznych zdrojov (napr. rôzne čističky, pôdne extrakty, riečne vody a pod.). Zmes sa spracováva podľa vyššie uvedeného postupu.

Na kontrolu aktivity aktivovaného kalu pozri nižšie „Funkčná kontrola".

1.6.1.4. Príprava testovacích roztokov

Do testovacej nádoby sa pridá 500 ml testovacej vody, 2,5 ml/liter roztoku minerálnych živín a aktivovaný kal v množstve zodpovedajúcom 0,2 až 1,0 g/liter sušiny v celkovom objeme. Následne sa pridá také množstvo zásobného roztoku testovanej látky, aby výsledná koncentrácia DOC v celkovej zmesi bola 50 až 400 mg/liter. Zodpovedajúce hodnoty COD sú 100 až 1 000 mg/liter. Doplní sa testovacou vodou do celkového objemu 1 ž 4 litre. Voľba celkového objemu závisí od počtu vzoriek, u ktorých stanovujeme DOC alebo COD a od objemu nevyhnutného na analytické postupy.

Bežne môžeme považovať objem 2 litre za dostačujúci. Paralelne s každou testovanou skupinou sa spúšťa kontrolná nádoba (slepý test); obsahuje iba aktivovaný kal a roztok minerálnych živín zarobený s testovacou vodou do celkového objemu rovnakého ako v testovanej skupine.

1.6.2. *Vykonanie testu*

Testovacie nádoby sú premiešavané magnetickými miešadlami alebo skrutkovitou vrtuľou pri difúznom osvetlení alebo v tmavej miestnosti pri teplote 20 až 25 °C. Prevzdušňovanie sa vykonáva stlačeným vzduchom, ktorý je, ak je to nevyhnutné, prečistený cez bavlneno - vlnené sitko a premývaciu fľašu. Musí byť zaručené, že kal sa neusadí a koncentrácia kyslíka nepoklesne pod 2 mg/liter.

Hodnota pH sa musí kontrolovať v pravidelných intervaloch (napr. denne) a ak je to nevyhnutné upravuje sa na pH 7 - 8.

Straty spôsobené vyparovaním sa dopĺňajú deionizovanou alebo destilovanou vodou v požadovaných množstvách tesne pred každým odberom vzorky. Vhodným krokom je zaznačiť si hladinu kvapaliny v nádobe pre začatím testu. Po každom odbere vzoriek sa robia nové značky (bez miešania a prevzdušňovania). Prvé vzorky sa vždy odoberajú 3 hodiny po začatí testu, aby sa určila adsorpcia testovaného materiálu aktivovaným kalom.

Následne po eliminácii testovaného materiálu sa denne alebo v iných pravidelných časových intervaloch stanovujú hodnoty DOC alebo COD. Vzorky z testovacích nádob a zo slepého pokusu sa prefiltrujú cez dôkladne premytý papierový filter. Prvých 5 ml testovacieho roztoku sa odstráni. Kal, ktorý sa ťažko filtruje, sa môže ešte predtým odstrániť centrifugáciou 10 minút. DOC a COD hodnoty sa stanovujú duplicitne. Test prebieha 28 dní.

*Poznámka:* Vzorky, ktoré zostávajú zakalené, sa filtrujú cez membránové filtre. Membránové filtre nesmú prepúšťať alebo adsorbovať žiadny organický materiál.

Kontrola funkčnosti aktivovaného kalu

Na kontrolu funkčnej kapacity aktivovaného kalu beží paralelne s každou testovanou sériou nádoba obsahujúca známu látku. Na tento účel sa najčastejšie využíva dietylénglykol.

Adaptácia

Ak sa analýzy uskutočňujú v relatívne krátkych časových intervaloch (napr. denne), môžeme z degradačnej krivky jasne pozorovať adaptáciu (pozri obrázok 2). Test by preto nemal začínať tesne pred víkendom.

Ak je adaptácia pozorovaná na konci periódy, test môže byť predĺžený, až kým nie je degradácia ukončená.

Poznámka: V prípade, že sú potrebné širšie poznatky o správaní sa adaptovaného kalu, aktivovaný kal je opätovne vystavený rovnakému testovanému materiálu podľa nasledujúceho postupu:

Vypne sa miešadlo a prevzdušňovač a nechá sa usadiť aktivovaný kal. Odčerpá sa supernatant a nádoba sa naplní opäť 2 litrami testovacej vody. Mieša sa 15 minút a znovu sa nechá usadiť. Po opätovnom odčerpaní supernatantu sa zvyšný kal použije na opakovanie testu s tým istým testovaným materiálom podľa 1.6.1.4 a 1.6.2. Aktivovaný kal možno izolovať okrem usadzovania aj centrifugáciou.

Adaptovaný kal sa môže zmiešať s čerstvým kalom do koncentrácie 0,2 až 1g sušiny/liter.

Analytické prostriedky

Bežne sa vzorky filtrujú cez dôkladne premyté papierové filtre (na premývanie sa používa deionizovaná voda).

Vzorky, ktoré zostávajú zakalené, sa filtrujú cez membránové filtre (0,45 μm).

Hodnoty DOC sa vo filtrátoch zo vzoriek stanovujú duplicitne (prvých 5 ml sa odstráni) prostredníctvom TOC zariadenia. Ak filtrát nie je možné analyzovať v ten istý deň, musí sa uskladňovať v chladničke do ďalšieho dňa. Dlhšie skladovanie sa nedoporučuje.

Koncentrácie COD sa stanovujú vo filtrátoch zo vzoriek COD analýzou postupom uvedeným v literatúre pod bodom 2.

## 2. ÚDAJE A HODNOTENIE

DOC a/alebo COD koncentrácie sa stanovujú zo vzorky najmenej duplicitne podľa uvedeného odseku 1.6.2. Degradácia v čase T sa prepočíta podľa vzorca (s definíciami) uvedeného v odseku 1.2.

Miera degradácie sa zaokrúhľuje na najbližšie celé percento. Množstvo degradácie dosiahnuté na konci testu sa vyjadruje ako „Biodegradovateľnosť v Zahn - Wellensovom teste".

Poznámka: Ak sa dosiahne úplná degradácia ešte pred koncom testu a tento výsledok sa potvrdí aj druhou analýzou nasledujúci deň, test môže byť uzavretý.

## 3. SPRÁVA

### 3.1. Správa z testu

Správa z testu obsahuje podľa možnosti nasledujúce informácie:

— počiatočnú koncentráciu testovanej látky,

— všetky ostatné informácie a výsledky experimentov týkajúcich sa testovanej látky, referenčnej látky, ak bola použitá, a slepého pokusu,

— koncentráciu po 3 hodinách,

— biodegradačnú krivku s opisom,

— dátum a miesto, odkiaľ boli testovacie organizmy odobraté, stav adaptácie, použité koncentrácie a pod.,

— vedecké zdôvodnenie akejkoľvek zmeny testovacieho procesu.

### 3.2. Interpretácia výsledkov

Úbytok DOC (COD), ktorý sa vyskytuje postupne v priebehu dní alebo týždňov, naznačuje, že látka je biodegradovaná.

V niektorých prípadoch však môže hrať úlohu fyzikálno - chemická adsorpcia a táto je indikovaná, ak sa vyskytne úplný alebo čiastočný úbytok do prvých troch hodín od začiatku testu a ak rozdiel medzi kontrolným a testovaným supernatantom zostáva na nečakane nízkej úrovni.

Ak rozdiely spadajú medzi biodegradáciu (alebo parciálnu biodegradáciu) a adsorpciu, sú nevyhnutné ďalšie testy.

Toto sa môže uskutočniť rôznymi spôsobmi, ale najpresvedčivejšie je použitie supernatantu alebo kalu ako inokula v základnom teste (prednostne respirometrický test).

Testovaná látka, ktorá vykazuje vysoký, neadsorpčný úbytok DOC (COD) v tomto teste, sa môže považovať za potenciálne biodegradovateľnú. Čiastočný, neadsorpčný úbytok naznačuje, že látka je predmetom aspoň čiastkovej biodegradácie. Nízky alebo nulový úbytok DOC (COD) môže byť zapríčinený inhibíciou mikroorganizmov testovanou látkou, čo možno tiež spozorovať lýzou alebo stratou kalu za vzniku kalných supernatantov. Test treba v týchto prípadoch zopakovať použitím nižších koncentrácií testovanej látky.

Použitie zložkovo - špecifickej analytickej metódy alebo $^{14}C$ - značenej testovanej látky môže zabezpečiť vyššiu citlivosť. V prípade použitia $^{14}C$ - značenej testovanej zložky potvrdzuje prítomnosť biodegradácie objavenie $^{14}CO_2$.

Ak sa výsledky uvádzajú vo forme primárnej biodegradácie, treba podľa možnosti priložiť vysvetlenie zmeny chemickej štruktúry, ktorá vedie k strate reakcie pôvodnej testovanej látky.

Platnosť analytickej metódy sa musí uviesť spolu s reakciou zistenou v testovacom médiu v slepom pokuse.

## 4. LITERATÚRA

(1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 302 B*, Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) Annex V C.9 Degradation: Chemical Oxygen Demand, Commission Directive 84/449/EEC, *Official Journal of the European Communities*, No L 251, 19.9.1984.

*Dodatok*

**PRÍKLAD VYHODNOTENIA**

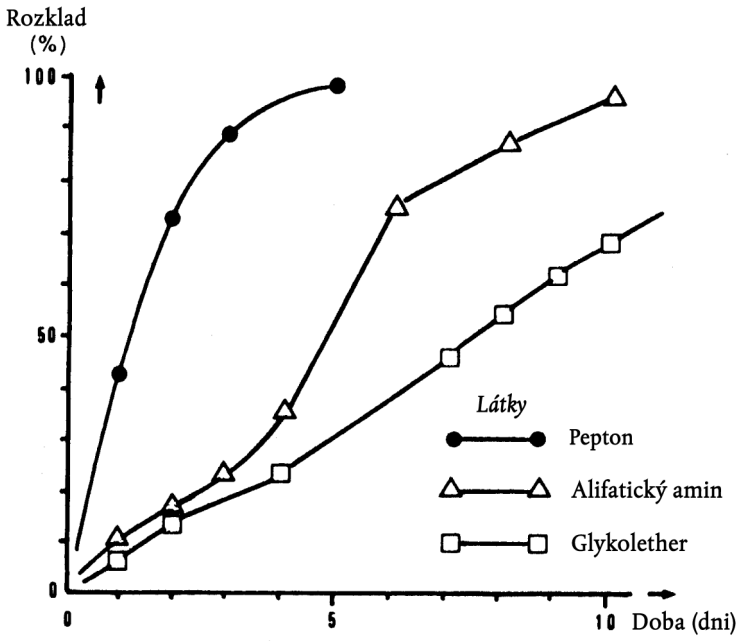
| | |
|---|---|
| **Organická zložka:** | kyselina 4-etoxybenzoová |
| Teoretická testovaná koncentrácia: | 600 mg/l |
| Teoretická hodnota DOC: | 390 mg/l |
| **Inokulum:** | čistička odpadových vôd z... |
| Koncentrácia: | 1 g sušiny/liter |
| Stav adaptácie: | neadaptovaný |
| **Analýza:** | stanovenie DOC |
| **Množstvo vzorky:** | 3 ml |
| **Kontrolná látka:** | dietylénglykol |
| **Toxicita zložky:** | žiadny toxický efekt pod 1 000 mg/l<br>Použitý test: Skúmavkový test fermentácie tabuľka |

| Doba testu | Kontrolná látka | | | | Testovaná látka | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Slepý pokus DOC [1] (mg/liter) | DOC [1] (mg/liter) | DOC [1] Čistý (mg/liter) | % degradácie | DOC [1] (mg/liter) | DOC [1] Čistý (mg/liter) | % degradácie |
| 0 | — | — | 300,0 | — | — | 390,0 | — |
| 3 hod. | 4,0 | 298,0 | 294,0 | 2 | 371,6 | 367,2 | 6 |
| 1 deň | 6,1 | 288,3 | 282,2 | 6 | 373,3 | 367,2 | 6 |
| 2 dni | 5,0 | 281,2 | 276,2 | 8 | 360,0 | 355,0 | 9 |
| 5 dní | 6,3 | 270,5 | 264,2 | 12 | 193,8 | 187,5 | 52 |
| 6 dní | 7,4 | 253,3 | 245,9 | 18 | 143,9 | 136,5 | 65 |
| 7 dní | 11,3 | 212,5 | 201,2 | 33 | 104,5 | 93,2 | 76 |
| 8 dní | 7,8 | 142,5 | 134,7 | 55 | 58,9 | 51,1 | 87 |
| 9 dní | 7,0 | 35,0 | 28,0 | 91 | 18,1 | 11,1 | 97 |
| 10 dní | 18,0 | 37,0 | 19,0 | 94 | 20,0 | 2,0 | 99 |

[1] Stredná hodnota troch stanovení DOC.

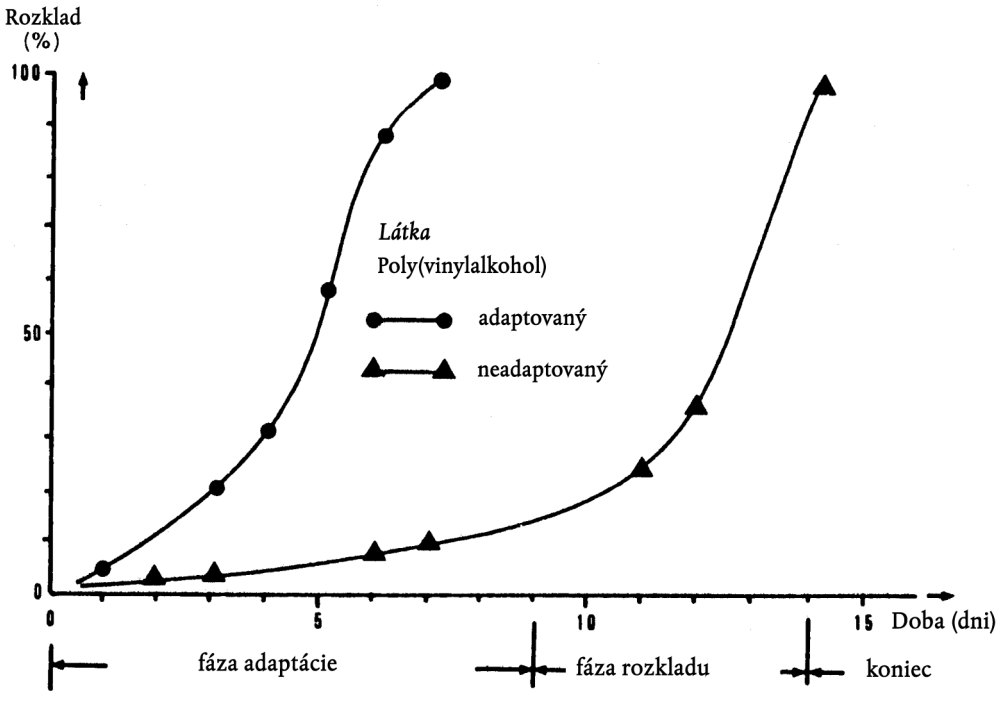
*Obrázok č. 1*

**Príklady biodegradačných kriviek**




*Obrázok č. 2*

**Príklady adaptácie kalu**



BIODEGRADÁCIA

SIMULAČNÉ TESTY NA AKTIVOVANOM KALE

## 1. METÓDA

### 1.1. Úvod

1.1.1. *Všeobecné poznámky*

Metóda je aplikovateľná iba na tie organické látky, ktoré pri koncentráciách použitých v teste vykazujú nasledujúce vlastnosti:

— sú rozpustné vo vode v rozsahu potrebnom na prípravu testovacích roztokov,

— pri testovacích podmienkach majú zanedbateľný tlak pár,

— nepôsobia inhibične na baktérie.

Informácia o relatívnom zastúpení hlavných zložiek testovaného materiálu sa použije pri interpretácii získaných výsledkov, obzvlášť v tých prípadoch, keď sú výsledky slabé alebo okrajové.

Informácia o toxicite látky k mikroorganizmom sa požaduje pri interpretácii slabých výsledkov a pri výbere vhodných testovacích koncentrácií.

1.1.2. *Stanovenie konečnej biodegradovateľnosti (DOC/COD analýza)*

Účelom tejto metódy je stanoviť konečnú biodegradovateľnosť meraním úbytku látky a iných metabolitov v modele čističky s aktivovaným kalom v koncentrácii zodpovedajúcej > 12 mg DOC/liter (alebo približne 40 mg COD/liter); koncentrácia 20 mg DOC/liter sa považuje za optimálnu. (DOC = rozpustený organický uhlík; COD = chemická spotreba kyslíka).

V testovanom materiále musí byť stanovený obsah organického uhlíka (alebo chemická spotreba kyslíka).

1.1.3. *Stanovenie primárnej biodegradovateľnosti (špecifická analýza)*

Účelom metódy je určenie primárnej biodegradovateľnosti látky v modele čističky s aktivovaným kalom v koncentrácii približne 20 mg/liter použitím špecifickej analytickej metódy (ak to dovoľuje analytická metóda a toxicita látky, môžu byť použité aj nižšie alebo vyššie koncentrácie). Týmto je umožnený odhad primárnej biodegradovateľnosti látky (strata pôvodnej chemickej štruktúry).

Účelom metódy nie je určenie mineralizácie testovanej látky.

Na stanovenie testovanej látky musí byť k dispozícii primeraná analytická metóda.

### 1.2. Definície a jednotky

1.2.1. *DOC/COD analýza*

Stupeň úbytku látky je daný ako:

$$GRD = \frac{T - (E - E_o)}{T} \times 100\,\% \qquad [1(a)]$$

kde:

GRD = stupeň úbytku v percentách DOC (alebo COD) v rámci daného priemerného retenčného času vzhľadom na testovaný materiál,

T = koncentrácia testovaného materiálu pri vtoku v mg DOC/liter (alebo mg COD/liter),

E = DOC (alebo COD) koncentrácia pri výtoku z testovanej jednotky v mg DOC/liter (alebo mg COD/liter),

$E_0$ = DOC (alebo COD) koncentrácia pri výtoku z slepého pokusu v mg DOC/liter (alebo mg COD/liter).

Degradácia je definovaná ako percentuálny DOC (alebo COD) úbytok v danom retenčnom čase vzhľadom na testovaný materiál.

1.2.2. *Špecifická analýza*

Percentuálny úbytok testovanej látky z vodnej fázy ($R_w$) v danom retenčnom čase je daný ako:

$$R_W = \frac{C_I - C_O}{C_I} \times 100\ \% \qquad [1(b)]$$

kde:

$C_I$ = koncentrácia látky pri vtoku do testovacej jednotky (mg látky/liter, stanovené špecifickou analýzou),

$C_0$ = koncentrácia látky vo výtoku z testovacej jednotky (mg látky/liter, stanovené špecifickou analýzou).

1.3. **Referenčné látky**

V prípade, že vyšetrujeme novú látku, je vhodné použiť referenčnú látku, avšak špecifickú referenčnú látku zatiaľ nie je možné odporučiť.

1.4. **Princíp testovacích metód**

Na stanovenie konečnej biodegradovateľnosti bežia paralelne dve pokusné jednotky aktivovaného kalu (OECD overovací test alebo test „pórovitej nádoby"). Testovaná látka sa pridáva pri vtoku (syntetické médium alebo domáce splaškové vody) jednej jednotky, zatiaľ čo do druhej sa pridávajú len samotné splaškové vody. Na stanovenie primárnej biodegradovateľnosti špecifickou analýzou vo vtoku a výtoku sa používa iba jedna jednotka.

DOC (alebo COD) koncentrácie sa merajú vo výtoku alebo je koncentrácia látky určená špecifickou analýzou.

Koncentrácia DOC sa vzhľadom k testovanému materiálu nemeria, ale je jednoducho stanovená.

Predpokladá sa, že rozdiely pri meraní koncentrácie DOC (alebo COD) medzi testovaným a kontrolným výtokom sú spôsobené nedegradovaným testovaným materiálom.

Ak sa uskutočňujú špecifické analýzy, je možné merať koncentráciu pôvodnej molekuly (primárnu biodegradáciu).

Jednotky možno uviesť do behu podľa „ systému spojených jednotiek" transinokulačným postupom.

1.5. **Kritériá kvality**

Počiatočná koncentrácia látky závisí od typu uskutočnenej analýzy a jej obmedzení.

1.6. **Opis testovacej metódy**

1.6.1. *Príprava*

1.6.1.1. Prístroje

Nevyhnutná je dvojica jednotiek rovnakého typu, okrem prípadov, keď sa používajú špecifické analýzy.

Možno použiť dva postupy:

Potvrdzujúci test podľa OECD

Zariadenie (dodatok č. 1) pozostáva zo zásobnej nádoby (A) pre syntetické médium, dávkovacej pumpy (B), prevzdušňovacej nádoby (C), separátora (D), vzduchovej pumpy (E) na recykláciu aktivovaného kalu a nádoby (F) na zber spracovaného výtoku.

Nádoby (A) a (F) musia byť zo skla alebo vhodného plastu a musia mať kapacitu aspoň 24 litrov. Pumpa (B) musí zabezpečiť nepretržitý tok syntetického média do prevzdušňovacej nádoby; na zabezpečenie vstupného toku a koncentrácie sa môže použiť akýkoľvek vhodný systém. Počas normálneho fungovania je výška separátora tak zafixovaná, aby objem zmesi v prevzdušňovacej nádobe bol 3 litre. Kremičitanová prevzdušňovacia frita (G) je zavesená v nádobe (C) na vrchole kónusu. Množstvo vzduchu pretečeného cez prevzdušňovač sa môže monitorovať rotametrom.

Vzduchová pumpa je zavedená tak, že aktivovaný kal zo separátora sa kontinuálne a pravidelne recykluje do prevzdušňovacej nádoby (C).

Test „pórovitej nádoby“

Pórovitá nádoba je zostrojená z plátov pórovitého polyetylénu (hrúbka 2 mm, veľkosť pórov maximálne 95 μm), ktoré sú zostavené do valca s priemerom 14 cm a s kónickou základňou 45° (obrázok č. 1 a 2 v dodatku č. 2). Pórovitá nádoba sa nachádza v nepriepustnej nádobe z vhodného plastu s priemerom 15 cm s výstupom vo výške 17,2 cm vo valcovitej časti, ktorá určuje objem (3 litre) v nádobe. Pevný podporný kruh z vhodného plastu na vrchu vnútornej nádoby je umiestnený tak, že vytvára medzi vnútornou a vonkajšou nádobou výtokový priestor 0,5 cm.

Pórovité nádoby môžu byť umiestnené v teplotne regulovanom vodnom kúpeli. Do spodnej časti vnútornej nádoby, na ktorej je umiestnený vhodný difuzér, je zabezpečený prívod vzduchu.

Nádoby (A) a (E) musia byť zo skla alebo vhodného plastu a musia mať kapacitu aspoň 24 litrov. Pumpa (B) musí zabezpečiť nepretržitý tok syntetického média do prevzdušňovacej nádoby; na zabezpečenie vstupného toku a koncentrácie sa môže použiť akýkoľvek vhodný systém.

Potrebné je mať náhradnú pórovitú nádobu na výmenu v prípade, že pôvodná nádoba sa upchá, upchaté nádoby sa čistia ponorením do roztoku chlórnanu na 24 hodín a následným dôkladným opláchnutím vo vode z vodovodu.

1.6.1.2. Filtrácia

Membránová filtračná aparatúra a membránové filtre s pórmi s veľkosťou 0,45 μm. Vhodné sú také membránové filtre, ktoré počas filtrácie neumožňujú prepúšťanie uhlíka ani adsorpciu látky.

1.6.1.3. Splaškové vody

Môže sa použiť vhodné syntetické médium alebo domáce splaškové vody.

Príklad syntetického média

V jednom litri vody z vodovodu sa rozpustí:

| | |
|---|---|
| peptón: | 160 mg, |
| mäsový extrakt: | 110 mg, |
| močovina: | 30 mg, |
| NaCl: | 7 mg, |
| $CaCl_2.2H_2O$: | 4 mg, |
| $MgSO_4.7H_2O$: | 2 mg, |
| $K_2HPO_4$: | 28 mg. |

Domáce odpadové vody

Odoberajú sa čerstvé každý deň z výtoku z primárnej usadzovacej nádoby čističky, ktorá spracováva predovšetkým domáce odpadové vody.

1.6.1.4. Zásobný roztok testovaného materiálu

Roztok testovaného materiálu, napr. 1 %, sa pripravuje ako prídavok do testovacej jednotky. Koncentrácia materiálu musí byť stanovená, aby bol známy vhodný objem, ktorý treba pridať do splaškov alebo priamo do testovacej jednotky cez druhú pumpu na získanie požadovanej testovacej koncentrácie.

1.6.1.5. Inokulum

Poznámka: Ak sa používajú domáce odpadové vody, nie je dôvod použiť inokulum s nízkou koncentráciou baktérií. Aktivovaný kal však možno použiť.

Môžu byť použité rôzne druhy inokúl.

Uvedené sú tri príklady vhodných inokúl:

a) Inokulum zo sekundárneho výtoku

Inokulum by malo byť získané zo sekundárneho výtoku dobrej kvality a odobraté z čističky spracovávajúcej prevažne domáce odpadové vody. V čase medzi odobratím vzorky a použitím sa musí výtok držať v aeróbnych podmienkach. Pri príprave inokula sa vzorka filtruje cez hrubý filter, prvých 200 ml sa odstráni. Až do použitia sa filtrát udržuje aeróbny. Inokulum sa musí použiť v deň odberu. Na inokuláciu sa použijú najmenej 3 ml.

b) Zložené inokulum

Inokulum zo sekundárneho výtoku:

Pozri vyššie uvedený opis.

Inokulum z pôdy:

100 g záhradnej pôdy (úrodnej, nie sterilnej) sa rozpustí v 1 000 ml bezchlórovej pitnej vody. (Pôdy s extrémne vysokým zastúpením ílu, piesku alebo humusu sú nevhodné). Po premiešaní sa nechá suspenzia usadzovať 30 minút. Supernatant sa filtruje cez hrubý filtračný papier, prvých 200 ml sa odstráni. Filtrát sa prevzdušňuje ihneď a až do použitia. Inokulum sa musí použiť v deň odberu.

Inokulum z povrchovej vody:

Ďalšie čiastkové inokulum je možné odobrať z mezosaprobickej povrchovej vody. Vzorka sa filtruje cez hrubý filter, prvých 200 ml sa odstráni. Až do použitia sa filtrát udržuje aeróbny. Inokulum sa musí použiť v deň odberu.

Rovnaké objemy čiastkových inokúl sa spoja, dobre premiešajú a konečné inokulum sa odoberie z tejto zmesi. Na inokuláciu sa použijú najmenej 3 ml.

c) Inokulum z aktivovaného kalu

Ako inokulum sa použije aktivovaný kal (nie viac ako 3 litre) s obsahom rozpustených pevných častíc do 2,5 g/liter, ktorý bol odobratý z prevzdušňovacej nádrže čističky spracovávajúcej prevažne domáce odpadové vody.

1.6.2. *Postup*

Test prebieha pri izbovej teplote, ktorá by mala byť v rozmedzí 18 až 25 °C.

Ak je to vhodné, test možno vykonať aj pri nižšej teplote (do 10 °C); ak je látka degradovaná, nie je potrebná ďalšie testovanie. Ak sa však látka nedegraduje, test sa uskutoční pri stabilnej teplote medzi 18 až 25 °C.

1.6.2.1. Doba zábehu: Formovanie kalu/stabilizácia jednotiek

Čas rastu kalu/stabilizácie je čas, počas ktorého koncentrácia suspendovaných častíc aktivovaného kalu a výkonnosť jednotiek narastá do stabilnej hodnoty za použitých prevádzkových podmienok.

Doba zábehu je doba, ktorá trvá od prvého pridania testovanej látky po čas, keď jej úbytok dosiahne relatívne konštantnú hladinu. Táto doba nesmie presiahnuť 6 týždňov.

Hodnotiace obdobie je trojtýždňové, 3 týždne od času, keď úbytok testovanej látky dosiahol relatívne konštantnú a zvyčajne vysokú hladinu. Pre tie látky, ktoré vykazujú nízku alebo žiadnu degradáciu počas prvých 6 týždňov, sa ako hodnotiace obdobie berú do úvahy nasledujúce 3 týždne.

Na začiatku treba jednotku potrebnú na jeden test naplniť inokulom zmiešaným s prítokom.

Prevzdušňovač [a vzduchová pumpa (E) v prípade použitia OECD overovacieho testu] a dávkovacie zariadenie (B) sa spustí do behu.

Prítok bez testovacej látky musí prejsť cez prevzdušňovaciu nádobu (C) rýchlosťou 1 liter za hodinu alebo pol litra za hodinu; zabezpečí sa tak priemerný retenčný čas 3 alebo 6 hodín.

Rýchlosť prevzdušňovania sa reguluje tak, aby bol obsah nádoby (C) konštantne v suspenznom stave a obsah rozpusteného kyslíka bol aspoň 2 mg/liter.

Vhodným spôsobom treba zabrániť peneniu. Nesmú sa použiť odpeňovače, ktoré inhibujú aktivovaný kal.

Kal, ktorý sa zhromaždil na vrchu prevzdušňovacej nádoby (C) [a v prípade OECD overovacieho testu na dne usadzovacej nádoby (D) a v obehových častiach], treba vrátiť do zmesi najmenej raz za deň zoškrabaním alebo iných vhodným spôsobom.

Ak kal nesedimentuje, možno jeho hustotu zvýšiť pridaním 2 ml 5 % roztok chloridu železitého, opakuje sa podľa potreby.

Výtok sa zhromažďuje v nádobe (E) 20 až 24 hodín a vzorka sa odoberá po dôkladnom premiešaní. Nádoba (E alebo F) musí byť starostlivo vyčistená.

S cieľom monitorovania a kontroly účinnosti procesu sa najmenej dvakrát do týždňa meria chemická spotreba kyslíka (COD) alebo rozpustený organický uhlík (DOC) vo filtráte z akumulovaného výtoku, ako aj vo filtrovanom prítoku (použijú sa membrány s veľkosťou pórov 0,45 μm, prvých približne 20 ml filtrátu sa odstráni).

Znižovanie hodnôt COD alebo DOC by sa malo ustáliť, ak dochádza k približne pravidelnej dennej degradácii.

Obsah sušiny v aktivovanom kale z prevzdušňovacej nádrže sa stanovuje dvakrát do týždňa (v g/liter). Jednotky môžu pracovať jedným z dvoch spôsobov: buď sa obsah sušiny v aktivovanom kale stanovuje dvakrát týždenne a ak je viac ako 2,5 g/liter, tak sa nadbytok aktivovaného kalu odstráni, alebo sa 500 ml zmesi odstráni z každej nádoby denne, aby sa získal priemerný retenčný čas kalu 6 dní.

Keď sú namerané a stanovené parametre [účinnosť procesu (v úbytku COD alebo DOC)], koncentrácia kalu, sedimentovateľnosť kalu, turbidita výtokov a pod.) dvoch jednotiek dostatočne stabilné, môže sa do prítoku jednej jednotky aplikovať testovaná látka, pozri odsek 16.2.2.

Alternatívne sa môže testovaná látka pridať na začiatku doby rastu kalu (1.6.2.1), obzvlášť, ak sa kal pridáva ako inokulum.

1.6.2.2. Postup testu

Pri zachovaní prevádzkových podmienok doby zábehu sa pridá príslušné množstvo (približne 1 %) zásobného roztoku testovaného materiálu do vtoku testovacej jednotky tak, aby sa dosiahla požadovaná koncentrácia testovaného materiálu v odpadovej vode (približne 10 až 20 mg DOC/liter alebo 40 mg COD/liter). To možno dosiahnuť vmiešaním zásobného roztoku do odpadovej vody denne alebo pomocou oddeleného tlakového systému. Táto koncentrácia sa môže dosiahnuť postupne. Ak nie je pozorovaný žiadny toxický účinok testovanej látky na aktivovaný kal, môžu byť testované aj vyššie koncentrácie.

Jednotka slepého pokusu je naplnená iba vtokom bez prídavku testovanej látky. Na analýzu sa odoberajú príslušné objemy výtoku a filtrujú sa cez membránové filtre (0,45 μm), pričom prvých približne 20 ml filtrátu sa odstráni.

Prefiltrované vzorky sa analyzujú v ten istý deň, v opačnom prípade musia byť zakonzervované vhodnou metódou, napr. použitím 0,05 ml 1 % roztoku chloridu ortuťnatého ($HgCl_2$) na každých 10 ml filtrátu alebo uskladnením pri teplote 2 až 4 °C 24 hodín, alebo na dlhšie obdobie pri teplote pod – 18 °C.

Doba zábehu s prídavkom testovanej látky by nemala presiahnuť 6 týždňov a doba hodnotenia by nemala byť kratšia ako 3 týždne, napr. približne 14 až 20 stanovení by malo byť k dispozícii pre výpočet konečného výsledku.

Systém spojených jednotiek

Spojenie jednotiek sa dosiahne výmenou 1,5 litra zmesi (vrátane kalu) z prevzdušňovacej nádoby s aktivovaným kalom medzi dvoma jednotkami raz denne. V prípade silne sa absorbujúceho testovaného materiálu sa odoberie len 1,5 litra supernatantu z usadzovacej nádoby a naleje sa do nádoby s aktivovaným kalom druhej jednotky.

1.6.2.3. Analýza

S cieľom sledovania správania látky sa môžu vykonávať dva typy analýz:

DOC a COD

Koncentrácie DOC sa stanovujú duplicitne pomocou analyzátora uhlíka a/alebo COD hodnoty sa určujú podľa literatúry pod bodom (2).

Špecifická analýza

Koncentrácie testovanej látky sa stanovujú vhodnou analytickou metódou. Ak je to možné, vykoná sa špecifické stanovenie látky adsorbovanej na kale.

## 2. ÚDAJE A HODNOTENIE

### 2.1. Systém spojených jednotiek

Pri použití „systému spojených jednotiek“ sa denné stupne úbytku (GRD) vypočítajú podľa odseku 1.2.1.

Tieto denné stupne úbytku GRD sa upravia na DRc pre prenos materiálu spôsobený transinokulačným postupom rovnicou [2] pre trojhodinový alebo rovnicou [3] pre šesťhodinový priemerný retenčný čas.

$$DRc = \frac{8}{7} DR - \frac{100}{7} \quad [2]$$

$$DRc = \frac{4}{3} DR - \frac{100}{3} \quad [3]$$

Vypočíta sa priemer série hodnôt DRc a okrem toho sa určí smerodajná odchýlka podľa rovnice [4]

$$s_{DRc} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} \left(\overline{DR} - DRc_i\right)^2}{n-1}} \quad [4]$$

kde:

$s_{DRc}$ = smerodajná odchýlka série hodnôt DRc

$\overline{DR}$ = priemer hodnôt DRc

n = počet stanovení.

Hodnoty ležiace mimo DRc sérií sa eliminujú podľa vhodnej štatistickej metódy, napr. Nalimov (6), na hladine pravdepodobnosti 95 % a prepočíta sa priemer a smerodajná odchýlka DRc sérií bez hodnôt ležiacich mimo sérií DRc.

Konečný výsledok sa potom vypočíta podľa rovnice [5] ako

$$DRc = \overline{DR} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} s_{DRc} \quad [5]$$

kde:

$t_{n-1};\alpha$ = tabuľková hodnota t pre n párov hodnôt E a $E_0$ a štatistická spoľahlivosť P (P = 1 - α), kde P je pri 95 % (1).

Výsledok je uvedený ako priemer s limitami tolerancie na hladine pravdepodobnosti 95 %, príslušná smerodajná odchýlka a počet údajov súboru hodnôt DRc bez hodnôt ležiacich mimo sérií, počet hodnôt ležiacich mimo sérií, napríklad

DRc = 98,6 ± 2,3 % úbytku DOC,

s = 4,65 % úbytku DOC,

n = 18,

x = počet hodnôt ležiacich mimo sérií.

2.2. **Systém nespojených jednotiek**

Fungovanie jednotiek sa môže skontrolovať nasledujúco:

$$\text{percento úbytku COD alebo DOC} = \frac{\text{COD alebo DOC kalu - COD alebo DOC výtoku}}{\text{COD alebo DOC kalu}} \times 100$$

Tieto denné úbytky možno znázorniť graficky, aby sa odhalili akékoľvek trendy, napr. k aklimatizácii.

2.2.1. *Použitie COD/DOC stanovení*

Denný stupeň úbytku GRD sa vypočíta podľa 1.2.1.

Vypočíta sa priemer série hodnôt GRD a okrem toho sa určí jeho smerodajná odchýlka podľa:

$$s_{DR} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} \left(\overline{DR} - DR_i\right)^2}{n-1}} \quad [6]$$

kde:

$s_{GRD}$ = smerodajná odchýlka série hodnôt $GRD_i$,

$\overline{DR}$ = priemer hodnôt $GRD_i$,

n = počet stanovení.

Hodnoty ležiace mimo GRD sérií sa eliminujú podľa vhodnej štatistickej metódy, napr. Nalimov (6), na hladine pravdepodobnosti 95 % a prepočíta sa priemer a smerodajná odchýlka GRD sérií bez hodnôt ležiacich mimo sérií GRD.

Konečný výsledok sa potom vypočíta podľa rovnice (7) ako

$$DR = \overline{DR} \pm \frac{t_{n-1;\alpha}}{\sqrt{n}} s_{DR} \quad [7]$$

kde:

$t_{n-1;\alpha}$ = tabuľková hodnota t pre n párov hodnôt E a $E_0$ a štatistická spoľahlivosť P (P = 1 - α), kde P je pri 95 % (1).

Výsledok je uvedený ako priemer s limitami tolerancie na hladine pravdepodobnosti 95 %, príslušná smerodajná odchýlka a počet údajov súboru hodnôt GRD bez hodnôt ležiacich mimo sérií, počet hodnôt ležiacich mimo sérií, napríklad

GRD = (98,6 ± 2,3) % úbytku DOC,

s = 4,65 % úbytku DOC,

n = 18,

x = počet hodnôt ležiacich mimo sérií.

2.2.2. *Použitie špecifickej analýzy*

Percentuálna eliminácia testovanej látky z vodnej fázy ($R_w$) sa vypočíta podľa odseku 1.2.2.

## 3. SPRÁVA

### 3.1. Správa z testu

Správa z testu obsahuje podľa možnosti nasledujúce informácie:

— formulár uvedený v dodatku č. 3, obsahujúci podmienky počas priebehu testu,

— ktoré prístroje boli použité (potvrdzujúci test OECD alebo test „pórovitej nádoby“),

— ktorý operačný systém bol použitý: systém spojených jednotiek alebo nie,

— aké odpadové vody: syntetické médium alebo domáce odpadové vody - v prípade domácich treba uviesť dátum a miesto odberu vzorky,

— aké inokulum sa použilo, s dátumom a miestom odberu vzorky,

— prehlásenie s opisom analytickej metódy v prípade, že sa použila špecifická analýza,

— znázornenie COD alebo DOC v závislosti od času, vrátane doby zábehu a doby hodnotenia,

— analytické vyjadrenie znovunadobudnutia testovanej látky ako hodnota COD z DOC hodnoty zásobného roztoku,

— ak sa uskutočnili špecifické analýzy, znázornenie percentuálneho úbytku testovanej látky z vodnej fázy v závislosti od času (doba zábehu a doba hodnotenia),

— priemerný úbytok DOC alebo COD hodnoty testovanej látky a smerodajná odchýlka sa vypočítajú z výsledkov z doby hodnotenia, napr. ak sa vyskytuje stabilný úbytok testovaného materiálu alebo doba stabilného priebehu,

— znázornenie koncentrácie aktivovaného kalu v závislosti od času,

— akékoľvek poznámky týkajúce sa aktivovaného kalu (odstránenie nadbytočného kalu, zväčšovanie objemu, $FeCl_3$ a pod.),

— koncentráciu látky použitej v teste,

— akékoľvek výsledky týkajúce sa analýzy vykonanej na kale,

— všetky informácie a experimentálne výsledky týkajúce sa testovanej látky a referenčnej látky, ak bola použitá,

— vedecké zdôvodnenie akýchkoľvek zmien v postupe.

3.2. **Interpretácia výsledkov**

Nízky úbytok testovanej látky z vodnej fázy môže byť zapríčinený inhibíciou mikroorganizmov testovanou látkou. Rovnako sa to môže prejaviť lýzou a stratou kalu za vzniku zakaleného supernatantu, ako aj poklesom účinnosti COD (alebo DOC) úbytku testovacej čističky.

Niekedy zohráva úlohu fyzikálno - chemická adsorpcia. Rozdiely medzi biologickým účinkom na molekulu a fyzikálno - chemickou adsorpciou je možné odhaliť analýzou, ktorá sa uskutočňuje na kale po príslušnej desorpcii.

Ak rozdiely spadajú medzi biodegradáciu (alebo čiastočnú biodegradáciu) a adsorpciu, nevyhnutné sú ďalšie testy.

To sa môže vykonať viacerými spôsobmi, ale najvhodnejšie je použiť supernatant ako inokulum v základnom teste (prednostne respirometrický test).

Ak sú pozorované vysoké úbytky DOC alebo COD, je to spôsobené biodegradáciou, zatiaľ čo pri nízkych úbytkoch sa nedá biodegradácia odlíšiť od eliminácie. Napríklad, ak rozpustná zložka vykazuje vysokú adsorpčnú konštantu 98 % a miera straty nadbytočného kalu je 10 % denne, možno uvažovať o eliminácii až do 40 %; ak je miera straty nadbytočného kalu 30 %, eliminácia spôsobená adsorpciou a odstránením s nadbytočným kalom môže vzrásť až na 65 % (4).

Ak sa používajú špecifické metódy, treba upriamiť pozornosť na vzťah medzi štruktúrou látky a použitou špecifickou analýzou. V tomto prípade nemôže byť pozorovaný fenomén interpretovaný ako mineralizácia látky.

4. **LITERATÚRA**

(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.

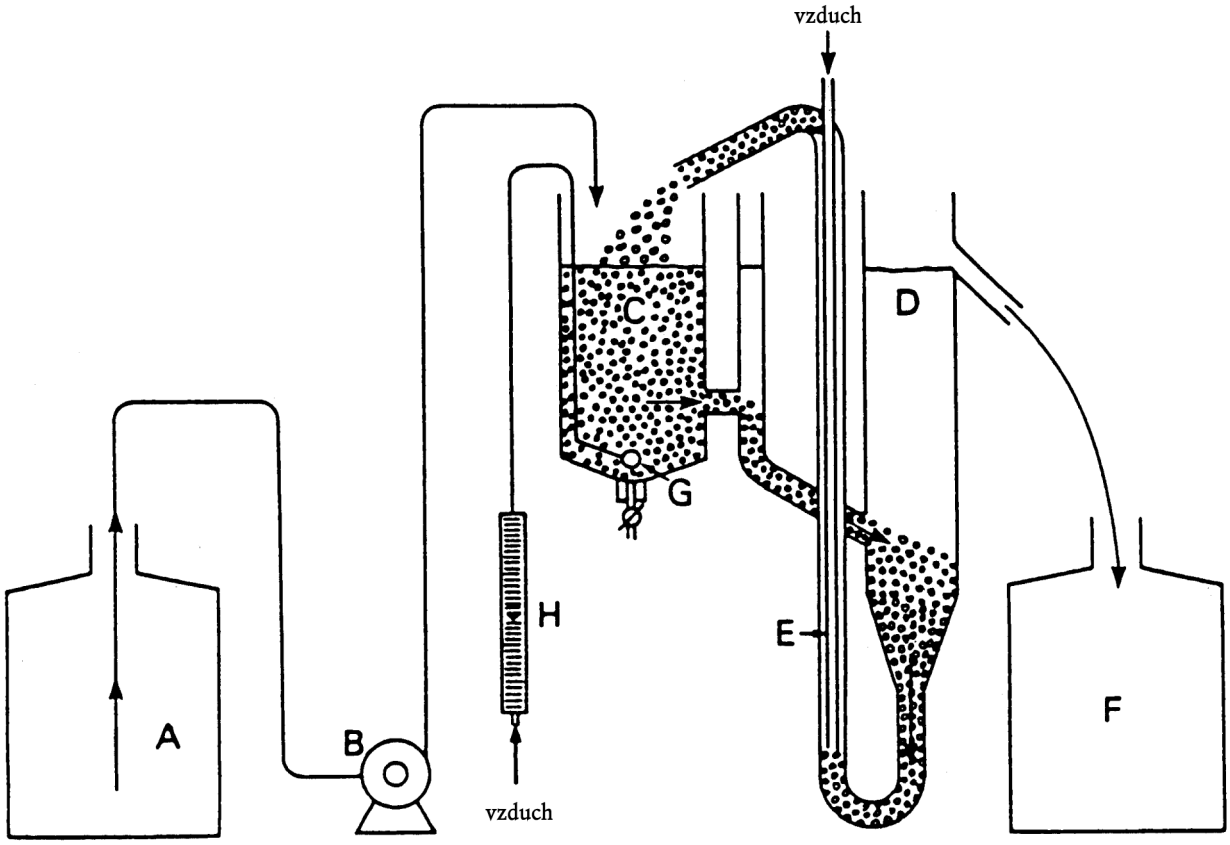
(4) Wierich, P., Gerike, P., The fate of soluble, recalcitrant, and adsorbing compounds in activated sludge plants, *Ecotoxicology and Enviromental Safety*, vol. 5, No 2, June 1981, s. 161 - 171.

(5) Council Directives 82/242/EEC a 82/243/EEC, *Official Journal of the European Communities*, No L 109, 22.4.1982, amending Council Directives 73/404/EEC a 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), s. 406 - 408.

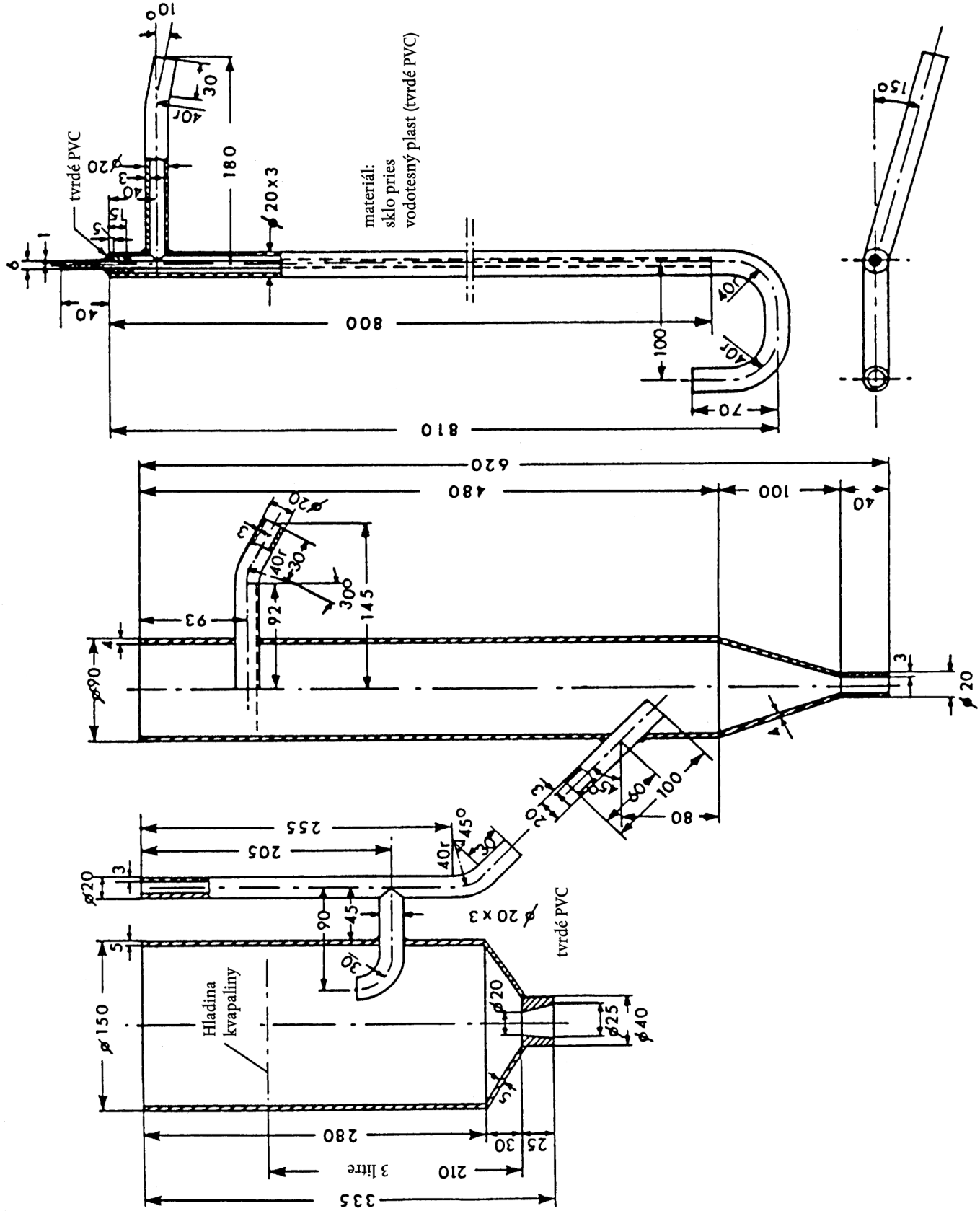
*Dodatok 1*

*Obrázok č. 1*




A: zásobná nádoba;
B: dávkovacie čerpadlo;
C: prevzdušňovacia nádoba (kapacita 3l);
D: usadzovacia nádrž;
E: mamutie čerpadlo;
F: zberná nádrž;
G: prevzdušňovač;
H: vzduchový prietokomer.

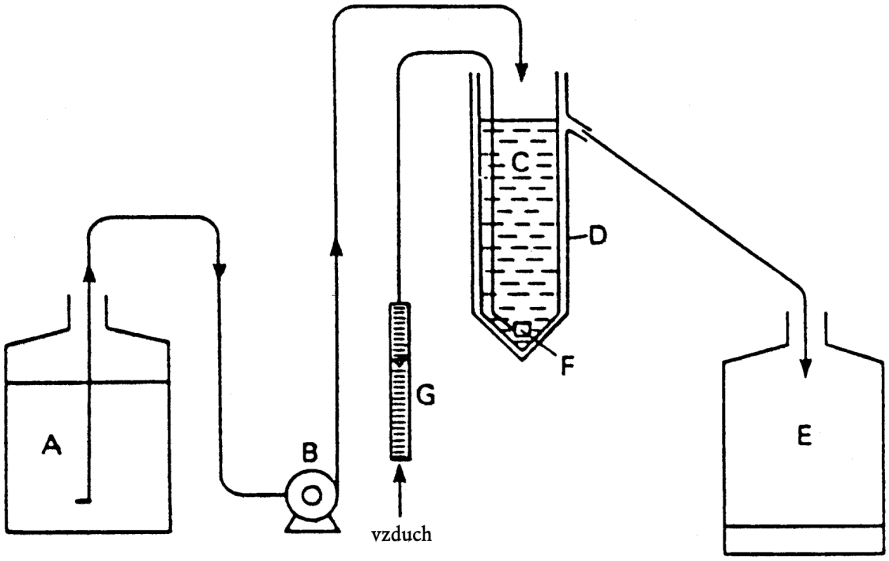
*Obrázok č. 2*


materiál:
sklo pries
vodotesný plast (tvrdé PVC)
tvrdé PVC
Hladina
kvapaliny
3 litre

*Dodatok 2*

*Obrázok č. 1*

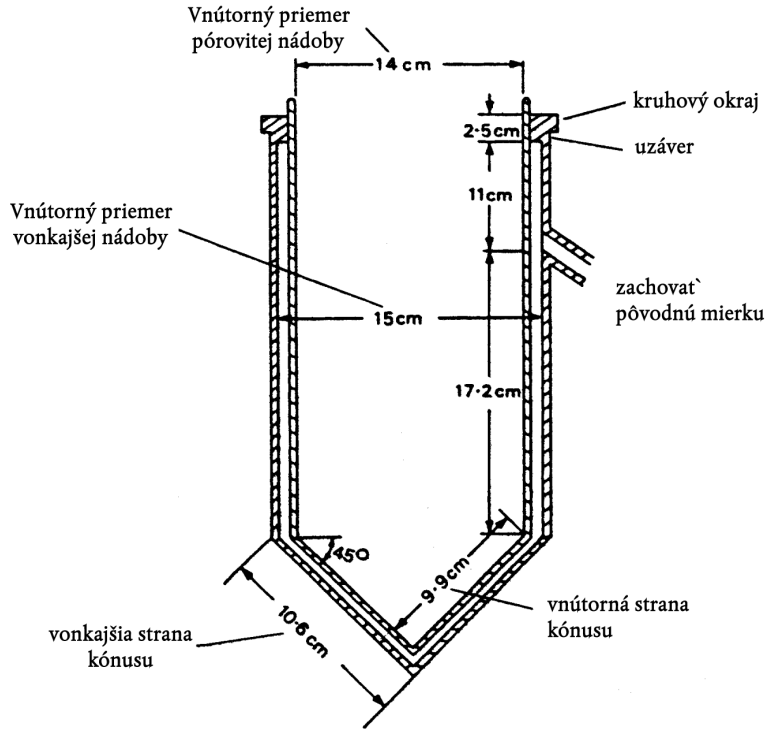
**Zariadenie používané na hodnotenie biodegradability**




A: skladovacia nádoba;
B: dávkovacia pumpa;
C: pórovitá prevzdušňovacia nádoba;
D: vonkajšia nepriepustná nádoba;
E: nádoba na zber výtoku;
F: difúzny fritový prevzdušňovač (aerátor);
G: prevzdušňovacia frita, rotameter (voliteľný).

*Obrázok č. 2*

**Detaily trojlitrovej prevzdušňovacej pórovitej nádoby**



*Dodatok 3*

**Operačné podmienky pre simulačný test aktivovaného kalu**

*V každej skupine sa skontroluje*

*Prístroje*

Potvrdzujúci test podľa OECD ☐
Pórovitá nádoba ☐

*Spôsob fungovania*

Jedna jednotka ☐
Spojené jednotky ☐
Nespojené jednotky ☐

*Transinokulácia*

Žiadna ☐
Aktivovaný kal ☐
Supernatant ☐

*Stredný retenčný čas*

Tri hodiny ☐
Šesť hodín ☐

*Základné živiny*

Domáce splaškové vody ☐
Syntetické médium ☐

*Inokulum*

Sekundárny výtok ☐
Zložené ☐
Aktivovaný kal ☐

*Prídavok testovaného materiálu*

Od začiatku ☐
Postupne ☐
Po vytvorení kalu ☐

*Analýza*

Špecifická analýza ☐
Chemická spotreba kyslíka ☐
Rozpustený organický uhlík ☐

BIODEGRADÁCIA

TEST RESPIRAČNEJ INHIBÍCIE AKTIVOVANÉHO KALU

## 1. METÓDA

### 1.1. Úvod

Opísaná metodika stanovuje vplyv testovanej látky na mikroorganizmy meraním miery respirácie v definovaných podmienkach a v prítomnosti odlišných koncentrácií testovanej látky.

Účelom metódy je poskytnúť rýchly skríning, pomocou ktorého by boli identifikované látky nepriaznivo vplývajúce na aeróbnu mikrobiálnu čističku odpadových vôd a indikované vhodné neinhibičné koncentrácie testovaných látok použiteľných v testoch biodegradovateľnosti.

Predbežné určenie rozsahu sledovaných koncentrácií testovanej látky môže predchádzať samotný test. Týmto spôsobom sa získajú informácie o škále koncentrácií použiteľných v hlavnom teste.

V teste musia byť zahrnuté aj dve kontroly bez testovanej látky, jedna kontrolná vzorka na začiatku a druhá na konci testovanej série koncentrácií. Každá dávka aktivovaného kalu by mala byť kontrolovaná aj voči referenčnej látke.

Test je aplikovateľný a vysokospoľahlivý hlavne pri látkach, ktoré sú rozpustné vo vode a zároveň stabilné, takže pravdepodobne zotrvávajú v určitej forme vo vodách.

Pri látkach, ktoré majú obmedzenú rozpustnosť v testovacom médiu, nie je možné stanoviť $EC_{50}$.

Výsledky založené na spotrebe kyslíka môžu viesť k chybným záverom v prípade, že testovaná látka vedie k odpojeniu oxidatívnej fosforylácie.

Pred vykonaním testu sa doporučuje mať nasledujúce informácie:

— rozpustnosť vo vode,

— tlak nasýtených pár,

— podrobný vzorec chemickej štruktúry,

— čistota testovanej látky.

*Odporúčanie:*

Aktivovaný kal môže potencionálne obsahovať patogénne organizmy, a preto s ním treba zaobchádzať so zvýšenou opatrnosťou.

### 1.2. Definície a jednotky

Miera respirácie je spotreba kyslíka mikroorganizmami odpadových vôd v aeróbnom kale znečistených vôd vyjadrená všeobecne v mg kyslíka ($O_2$) na mg kalu za hodinu.

S cieľom vypočítania inhibičného efektu testovanej látky pri určitej koncentrácii je miera respirácie vyjadrená ako percento priemeru dvoch kontrolných mier respirácie:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{Rc_1 + Rc_2}\right) \times 100 = \text{percento inhibície}$$

kde:

$R_s$ = miera spotreby kyslíka pri testovanej koncentrácii testovanej látky,

$Rc_1$ = miera spotreby kyslíka, kontrola 1,

$Rc_2$ = miera spotreby kyslíka, kontrola 2.

$EC_{50}$ pri tomto teste predstavuje koncentráciu testovanej látky, pri ktorej je miera respirácie 50 % v porovnaní s kontrolou, za podmienok stanovených touto metódou.

1.3. **Referenčné látky**

Ako referenčnú látku sa odporúča použiť 3,5-dichlórfenol, ako známy inhibítor respirácie a tester $EC_{50}$ a to na každej vzorke aktivovaného kalu, kde je prostriedkom kontroly abnormálnej citlivosti kalu.

1.4. **Princíp testovacej metódy**

Miera respirácie aktivovaného kalu vyživovaného štandardným množstvom syntetického média sa meria po kontaktnom čase 30 minút alebo po troch hodinách, alebo v oboch časoch. Miera respirácie toho istého aktivovaného kalu v prítomnosti rôznych koncentrácií testovanej látky v inak rovnakých podmienkach sa meria tiež. Inhibičný efekt testovanej látky v určitej koncentrácii sa vyjadruje ako percento z priemeru mier respirácie dvoch kontrol. Hodnota $EC_{50}$ sa vypočíta z výsledkov získaných pri rôznych koncentráciách testovanej látky.

1.5. **Kritériá kvality**

Platnosť výsledkov testu je splnená, ak:

— hodnoty získané v dvoch kontrolách miery respirácie neprekračujú rozdiel 15 %,

— $EC_{50}$ (po 30 minútach a/alebo 3 hodinách) pri 3,5-dichlórfenole nepresahuje rozmedzie hodnôt 5 mg/liter až 30 mg/liter.

1.6. **Opis testovacej metódy**

1.6.1. *Reagenčné látky*

1.6.1.1. Roztoky testovanej látky

Roztoky testovanej látky musia byť čerstvo pripravené na začiatku testu zo zásobného roztoku. Doporučuje sa koncentrácia zásobného roztoku 0,5 g/liter, ak sa postupuje podľa popísaného protokolu.

1.6.1.2. Roztok referenčnej látky

Roztok 3,5-dichlórfenolu môže byť pripravený napríklad rozpustením 0,5 g 3,5-dichlórfenolu v 10 ml 1M NaOH, predtým rozriedeným v približne 30 ml destilovanej vody, pridaním za miešania s 0,5M $H_2SO_4$ do bodu počiatočného zrážania – vyžaduje sa približne 8 ml 0,5M $H_2SO_4$ - a následným zriedením zmesi na jeden liter s destilovanou vodou. Predpokladané pH v pripravenej zmesi sa pohybuje v rozmedzí 7 až 8.

1.6.1.3. Syntetické médiá

Syntetické médiá sa vytvoria rozpustením nasledovných množstiev látok v 1 litri vody:

— 16 g peptónu,

— 11 g mäsového extraktu,

— 3 g močoviny,

— 0, 7 g NaCl,

— 0, 4 g $CaCl_2.2H_2O$,

— 0, 2 g $MgSO_4.7H_2O$,

— 2, 8 g $K_2HPO_4$.

Poznámka 1: Dané syntetické médium má 100 - násobne vyššiu koncentráciu, ako je opísané v Technickej správe OECD: „Navrhnuté metódy pre stanovenie biodegradovateľnosti surfaktantov používaných v syntetických detergentoch“ (11. jún 1976) s doplnením hydrogenfosforečnanu didraselného.

Poznámka 2: Ak pripravené médium nie je okamžite použité, môže byť skladované v tme pri 0 až 4 °C, ale nie dlhšie ako 1 týždeň, v podmienkach, ktoré nevyvolávajú možné zmeny v jeho zložení. Médium môže byť pred uskladnením sterilizované, prípadne sa peptón a mäsový extrakt pridajú krátko pred prevedením testu. Pred použitím musí byť médium dôkladne premiešané a pH musí byť upravené na požadovanú hodnotu.

1.6.2. *Prístroje*

Meracie prístroje: presný dizajn nie je rozhodujúci. Predná časť by mala byť dostatočne priestorná a sonda by mala priliehať tesne ku hrdlu meracej nádoby.

Vyžaduje sa normálne laboratórne vybavenie a špeciálne nasledovné:

— merací prístroj,

— prevzdušňovacie zariadenie,

— pH elektródy a meracie zariadenie,

— kyslíková elektróda.

1.6.3. *Príprava inokula*

V teste sa ako mikrobiálne inokulum používa aktivovaný kal z čističky odpadových vôd, spracovávajúcej prevažne domáce splaškové vody.

Ak je to potrebné, v laboratórnych podmienkach môžu byť pred použitím odstránené hrubé nečistoty, a to usadzovaním počas kratšej doby, približne 15 minút a následným stočením vrchnej vrstvy jemnejších pevných častíc. Alternatívou k uvedenému postupu môže byť miešanie kalu počas niekoľkých sekúnd za použitia miešadla.

Okrem toho, ak sa predpokladá prítomnosť inhibičného materiálu, môže byť aktivovaný kal premývaný s vodou z vodovodu alebo s izotonickým roztokom. Po centrifugácii sa supernatant zleje a procedúra sa opakuje trikrát.

Malé množstvo kalu sa zváži a vysuší. Z výsledkov sa vypočíta množstvo vlhkého kalu, ktoré musí byť suspendované vo vode s cieľom získania aktivovaného kalu s obsahom pevných častíc v rozmedzí od 2 – 4 g/liter po zmiešaní s kvapalinou. Týmto spôsobom sa dosiahne hladina koncentrácie v rozmedzí od 0,8 – 1,6 g/liter v testovanom médiu, ak sú predchádzajúce doporučenia danej procedúry dodržané.

Ak kal nie je možné spracovať v deň odberu vzorky, pridá sa 50 ml syntetického kalu na každý liter aktivovaného kalu pripraveného podľa predchádzajúcich doporučení, a takto spracovaná zmes je potom prevzdušňovaná cez noc pri teplote 20 ± 2 °C a následne aj počas celého dňa pred použitím. Pred samotným testom sa skontroluje pH a ak je to potrebné, tak sa upraví na 6 až 8. Pevné častice prítomné v kvapalnej zmesi sa môžu stanoviť podľa predchádzajúcich doporučení.

Ak sa vzorky z toho istého aktivovaného kalu spracujú počas viacerých nasledovných dní (maximálne štyri dni), pridáva sa ďalších 50 ml syntetického média na liter kalu na konci každého pracovného dňa.

1.6.4. *Vykonanie testu*

| | |
|---|---|
| Trvanie/kontaktný čas: | 30 minút a/alebo tri hodiny, počas ktorých sa prevzdušňuje |
| Voda: | Pitná voda (ak je potrebné, s odstránením chlóru) |
| Vzduch: | Čistý vzduch, bez olejových stôp. Prúd vzduchu je 0, 5 – 1 l/minútu |
| Merací prístroj: | Fľaša s plochým rovným dnom, ako BSK – nádoba |
| Merač kyslíka: | Vhodná kyslíková elektróda, s rekordérom |
| Živný roztok: | Syntetické médium (pozri vyššie) |
| Testovaná látka: | Testovaná látka je čerstvo pripravená na začiatku testu |
| Referenčná látka: | 3,5-dichlórfenol (aspoň v troch koncentráciách) |
| Kontroly: | Inokulované vzorky bez testovanej látky |
| Teplota: | 20 ± 2 °C |

Navrhnutá experimentálna procedúra, podľa ktorej sa postupuje v prípade testovanej aj referenčnej látky počas trojhodinovej kontaktnej doby, je nasledovná:

Používajú sa oddelené nádoby (napr. 1 - litrové kadičky).

Testovaná látka sa pripraví aspoň v piatich koncentráciách, pričom jednotlivé koncentrácie by sa mali zväčšovať o konštantný faktor nepresahujúci hodnotu 3,2.

V čase „0“ sa pridá 16 ml syntetického média do vody do objemu 300 ml. Následne sa pridá 200 ml mikrobiálneho inokula a pripravená zmes v objeme 500 ml sa preleje do prvej nádoby (prvá kontrola $C_1$).

Testovacie nádoby by mali byť kontinuálne prevzdušňované. Malo by sa zabezpečiť, aby koncentrácia rozpusteného kyslíka v zmesi neklesla pod 2,5 mg/liter a aby tesne pred meraním miery respirácie bola koncentrácia $O_2$ približne 6,5 mg/liter.

Po „15 minútach“ (15 minút je náhodný, ale konvenčne stanovený čas) sa predchádzajúce meranie zopakuje, ale s pridaním 100 ml testovanej látky zo zásobného roztoku k 16 ml syntetického média pred doplnením vody do 300 ml a potrebného množstva mikrobiálneho inokula, aby sa pripravila zmes s výsledným objemom 500 ml. Pripravená zmes sa preleje do druhej nádoby a prevzdušňuje sa podľa predchádzajúceho postupu. Tento proces sa opakuje v 15 - minútových intervaloch s rôznymi objemami zásobného roztoku testovanej látky, čím sa získa séria nádob obsahujúcich rôzne koncentrácie testovanej látky. Nakoniec sa pripraví druhá kontrola ($C_2$).

Po troch hodinách sa zmeria pH a dôkladne premiešaný obsah prvej nádoby sa preleje do meracieho prístroja, kde sa odmeria miera respirácie počas doby nie dlhšej ako 10 minút.

Meranie sa opakuje vo všetkých pripravených nádobách v 15 - minútových intervaloch tak, aby kontaktný čas pri každej nádobe boli tri hodiny.

Referenčná látka je testovaná pri každej vzorke mikrobiálneho inokula rovnakým spôsobom.

Ak sa jednotlivé merania vykonávajú v kontaktnom čase 30 minút, je nevyhnutné použiť odlišný režim (viac ako jeden kyslíkový merač).

Ak sa vyžaduje meranie chemickej spotreby kyslíka, pripravia sa ďalšie nádoby obsahujúce testovanú látku, syntetické médium a vodu, ale bez aktivovaného kalu. Spotreba kyslíka sa meria a zaznamenáva pri prevzdušňovaní po 30 minútach alebo 3 hodinách (kontaktný čas).

## 2. ÚDAJE A PLATNOSŤ

Miera respirácie sa vypočítava zo zhotoveného záznamu medzi hodnotami približne 6,5 mg $O_2$/liter a 2,5 mg $O_2$/liter alebo po 10 minútach, počas ktorých bola miera respirácie nízka. Časť respiračnej krivky, nad ktorou sa meria miera respirácie, by mala byť lineárna.

Ak rozdiel v miere respirácie medzi dvoma kontrolami prekračuje 15 %, alebo ak $EC_{50}$ (v kontaktnom čase 30 minút a/alebo 3 hodiny) referenčnej látky prekračuje akceptovateľné rozmedzie hodnôt (5 až 30 mg/liter pri 3,5-dichlórfenole), test je neplatný a musí sa zopakovať.

Percento inhibície sa vypočítava pri každej koncentrácii testovanej látky (pozri 1.2). Percento inhibície je vynášané do grafu proti koncentrácii testovanej látky na logaritmickom alebo log-normálnom papieri a odvodí sa hodnota $EC_{50}$.

95 % úroveň spoľahlivosti pre $EC_{50}$ sa určuje podľa štandardných postupov.

## 3. SPRÁVA

### 3.1. Správa z testu

Písomná správa by mala v rámci možností obsahovať nasledujúce údaje:

— testovaná látka: údaje o chemických vlastnostiach,

— testovací systém: zdroj, koncentrácia a prípadné predchádzajúce ošetrenie aktivovaného kalu,

— testovacie podmienky:

  — pH reakčnej zmesi pred meraním respirácie,

  — teplota počas testu,

  — trvanie testu,

  — referenčná látka a namerané $EC_{50}$,

  — abiotická spotreba kyslíka (ak je),

— výsledky:

  — všetky údaje z meraní,

  — inhibičná krivka a metódy pre výpočet $EC_{50}$,

  — $EC_{50}$ a, ak je to možné, 95 % úroveň spoľahlivosti, $EC_{20}$ a $EC_{80}$,

  — všetky pozorovania a akékoľvek odchýlky od testovacích metód, ktoré by mohli ovplyvniť výsledky.

### 3.2. Interpretácia údajov

Hodnota $EC_{50}$ sa považuje len za pomôcku pri určovaní pravdepodobnej toxicity testovanej látky pre spracovanie odpadových vôd aktivovaným kalom alebo pre mikroorganizmy prítomné v odpadových vodách. Komplexné interakcie, ktoré sa vyskytujú v životnom prostredí, nemôžu byť presne simulované v laboratórnych podmienkach. Okrem toho, testované látky, ktoré majú tendenciu inhibovať oxidáciu amoniaku, môžu tiež viesť k tvorbe atypických inhibičných kriviek. Preto interpretácia týchto kriviek vyžaduje zvýšenú pozornosť.

4. **LITERATÚRA**

(1) Medzinárodný štandard ISO 8192-1986.

(2) Broecker, B., Zahn, R., *Water Research* 11, 1977, s. 165.

(3) Brown, D., Hitz, H. R., Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 1981, s. 245.

(4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), *Recommended Method No 103*, tiež opísané podľa:

(5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, 1976, s. 80.

(6) Schefer, W., *Textilveredlung* 6, 1977, s. 247.

(7) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 209*, Decision of the Council C(81) 30 final.

BIODEGRADÁCIA

MODIFIKOVANÝ SCAS – TEST

1. **METÓDA**

1.1. **Úvod**

Cieľom metódy je zhodnotiť potencionálnu konečnú biodegradovateľnosť vo vode rozpustných, stabilných organických látok, ak sú vystavené účinku relatívne vysokej koncentrácie mikroorganizmov počas dlhšieho časového obdobia. Životaschopnosť mikroorganizmov je udržiavaná počas tejto doby denným pridávaním živín sedimentovaných v odpadových vodách. (Počas víkendu môžu byť odpadové vody skladované pri 4 °C, alebo sa ako alternatíva môže použiť umelé syntetické médium podľa testov schválených OECD.)

Pri interpretácii výsledkov sa musí zobrať do úvahy možnosť fyzikálno - chemickej adsorpcie pri pevných látkach v testovacom systéme.

V dôsledku dlhej detekčnej doby kvapalnej fázy (36 hodín) a prerušovaného pridávania živín, test nesimuluje také experimentálne podmienky, aké sa docielia pri čističke odpadových vôd. Výsledky získané pri rôznych testovaných látkach indikujú vysoký biodegradačný potenciál testu.

Podmienky navodené testom sú vysoko priaznivé k selekcii a/alebo adaptácii mikroorganizmov, ktoré majú schopnosť degradovať testované látky. (Procedúra môže byť využitá aj pre prípravu aklimatizovaného inokula, ktoré je prispôsobené použitiu v ďalších testoch.)

V tejto metóde sa na stanovenie podľahnutia testovanej látky biodegradácii používa nameraná koncentrácia rozpusteného organického uhlíka (DOC). Uprednostňuje sa stanovenie rozpusteného organického uhlíka (DOC) po acidifikácii a prečistení ako rozdiel $C_{celkové} - C_{anorganické}$.

Simultánne využitie špecifických analytických metód umožňuje stanoviť primárnu degradáciu látky (nedá sa už detekovať parentálna chemická štruktúra).

Metóda je aplikovateľná len na tie organické látky, ktoré pri danej koncentrácii použitej v teste:

— sú rozpustné vo vode (aspoň 20 mg rozpusteného organického uhlíka/liter),

— majú zanedbateľný tlak nasýtených pár,

— nepôsobia inhibične na baktérie,

— nedochádza u nich k signifikantnej adsorpcii v testovacom systéme,

— nemôže pri nich dôjsť k úbytku v testovacom roztoku penením.

V materiáli použitom v teste sa musí stanoviť obsah organického uhlíka.

Pri interpretácii získaných výsledkov sú vhodné informácie o relatívnom zložení hlavných komponentov v testovacom materiáli, najmä v prípadoch nízkych alebo marginálnych hodnôt výsledkov.

Pri interpretácii nízkych hodnôt výsledkov a pri selekcii vhodných testovacích koncentrácii sú užitočné informácie o možnej toxicite testovanej látky voči mikroorganizmom.

1.2. **Definície a jednotky**

$C_T$ = koncentrácia testovanej látky vo forme organického uhlíka, ktorý je prítomný alebo pridaný do média na začiatku prevzdušňovania (mg/liter),

$C_t$ = koncentrácia rozpusteného organického uhlíka (DOC), zistená v teste pri ukončení prevzdušňovania (mg/liter),

$C_c$ = koncentrácia rozpusteného organického uhlíka (DOC), zistená v kontrole testu po ukončení prevzdušňovania (mg/liter).

V tejto metóde je biodegradácia definovaná ako vymiznutie organického uhlíka. Biodegradácia môže byť vyjadrená ako:

1. Percento úbytku $D_{da}$ z množstva látky pridanej denne:

$$D_{da} = \frac{C_T - (C_t - C_c)}{C_T} \times 100 \quad [1]$$

kde $D_{da}$ = degradácia/denný prídavok.

2. Percento úbytku $D_{ssd}$ z množstva látky prítomnej na začiatku každého dňa:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t\,(i+1)} + 3C_{c\,(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \quad [2(a)]$$

$$= \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \quad [2(b)]$$

kde $D_{ssd}$ = degradácia/látka na začiatku dňa,

indexy i a (i + 1) sa vzťahujú na deň merania.

Vzorec 2 a) sa odporúča, ak hodnota rozpusteného organického uhlíka (DOC) v efluente lavíruje zo dňa na deň, kým vzorec 2 b) sa používa v prípade relatívne konštantnej hodnoty rozpusteného organického uhlíka (DOC) v efluente počas dní merania.

1.3. **Referenčné látky**

V určitých prípadoch, ak to výskum novej látky vyžaduje, odporúča sa využiť referenčnú látku. Žiadna konkrétna referenčná látka sa pri tomto teste neuvádza.

Údaje o niektorých látkach, vyhodnotené prostredníctvom kruhového testu, sa uvádzajú hlavne v dodatku 1, kvôli prípadnej kalibrácii metódy alebo pre porovnanie výsledkov získaných v ďalšej použitej metóde.

1.4. **Princíp testovacej metódy**

Aktivovaný kal z čističky odpadových vôd je umiestnený do semikontinuálnej jednotky aktivovaného kalu – SCAS jednotky. Pridá sa testovaná látka a sediment z domácich splaškových vôd a zmes sa prevzdušňuje 23 hodín. Po zastavení prevzdušňovania sa kal nechá usadiť a supernatant nad usadeninou sa odstráni.

Zostávajúci usadený kal v prevzdušňovacej komore sa zmieša s alikvótnym množstvom testovanej látky a sedimentom splaškových vôd a celý cyklus sa zopakuje.

Biodegradácia sa stanovuje určením obsahu rozpusteného organického uhlíka (DOC) v supernatante. Táto hodnota sa porovná s hodnotou získanou v kontrolnej vzorke, ktorá je tvorená len usadenými odpadovými vodami.

Pri použití špecifických analytických metód, môžu byť odmerané zmeny, ktoré nastali v koncentrácii parentálnej molekuly v dôsledku biodegradácie (primárna biodegradovateľnosť).

1.5. **Kritériá kvality**

Reprodukovateľnosť tejto metódy založenej na úbytku rozpusteného organického uhlíka (DOC) zatiaľ nebola preukázaná. (Ak uvažujeme primárnu biodegradovateľnosť, veľmi presné údaje sa získajú pri látkach, ktoré sú degradované vo veľkom rozsahu.)

Citlivosť metódy je do veľkej miery ovplyvnená variabilitou slepého pokusu a v menšej miere presnosťou stanovenia rozpusteného organického uhlíka (DOC) a hladinou testovanej látky v počiatočnom objeme na začiatku každého cyklu.

1.6. **Opis testovacej metódy**

1.6.1. *Príprava*

Použije sa čistá prevzdušňovacia aparatúra vo vhodnej veľkosti alebo, ako alternatíva, zostavená pôvodná 1,5 l SCAS jednotka s prívodovou trubicou vzduchu (obr. 1) pre každú testovanú látku a kontroly. Stlačený vzduch dodávaný do testovacích jednotiek po prečistení cez vatový filter by mal byť bez prímesi organického uhlíka a vopred saturovaný vodou, aby sa zabránilo strate vyparovaním.

Vzorka zmesi, obsahujúca 1 až 4 g suspendovanej pevnej látky/liter, sa získa z aktivovaného kalu čističky odpadových vôd spracovávajúcej domáce splaškové vody. Na jednu prevzdušňovaciu jednotku sa vyžaduje približne 150 ml tejto zmesi.

Zásobné roztoky testovanej látky sa pripravujú v destilovanej vode, pričom normálne vyžadovaná koncentrácia je 400 mg/liter vo forme organického uhlíka, z čoho vyplýva, že koncentrácia testovanej zložky na začiatku každého cyklu prevzdušňovania je 20 mg/liter vo forme uhlíka, ak nedochádza k biodegradácii.

Ak to umožňuje toxicita látky voči mikroorganizmom, môže sa použiť aj vyššia koncentrácia.

Meria sa obsah organického uhlíka v zásobnom roztoku.

1.6.2. *Podmienky testu*

Teplota pri teste sa má pohybovať v rozmedzí 20 °C až 25 °C.

Používa sa vysoká koncentrácia aeróbnych mikroorganizmov (1 g/liter až 4 g/liter suspendovanej pevnej látky) a efektívna detenčná doba je 36 hodín. Uhlíkový materiál zo živín odpadových vôd podlieha rýchlo oxidácii, v normálnych podmienkach zoxiduje po ôsmych hodinách od začiatku každého cyklu prevzdušňovania. Potom do ukončenia cyklu prevzdušňovania kal respiruje endogénne a počas tejto doby je jediným dostupným zdrojom testovaná látka, ak aj táto nie je ľahko metabolizovateľná. Tieto charakteristiky v kombinácii s každodennou inokuláciou a za použitia domácich splaškových vôd ako média poskytujú vysokovhodné podmienky pre aklimatizáciu ako aj pre vysokú mieru biodegradácie.

1.6.3. *Prevedenie testu*

Odoberie sa vzorka zmesi z kalu aktivovaného domácimi splaškovými vodami z čističky alebo laboratórnej jednotky a udržiava sa v aeróbnom stave až do jej spracovania v laboratóriu. Každá prevzdušňovacia jednotka ako aj kontrolná jednotka sa naplní 150 ml roztoku zmesi (v prípade použitia originálneho testu SCAS sa vynásobí uvedený objem desiatimi) a následne sa začne prevzdušňovať. Po 23 hodinách sa prevzdušňovanie ukončí a kal sa nechá 45 minút sedimentovať. Po otočení kohútika na každej nádobe sa odoberie 100 ml supernatantu. Vzorka sedimentu z domácich splaškových vôd sa získava tesne pred použitím a pridá sa 100 ml kalu, ktorý zostal v jednotlivých prevzdušňovacích jednotkách. Prevzdušňovanie sa následne obnoví. V tomto štádiu sa nepridáva žiadny testovaný materiál, ale do jednotky sa dodáva denne zmes domácich splaškových vôd, až pokým sa nevytvorí po sedimentácii čistý supernatant. Tento proces zvyčajne prebieha dva týždne, počas ktorých sa približuje obsah rozpusteného organického uhlíka (DOC) v supernatante konštantnej hodnote na konci každého cyklu prevzdušňovania.

Na konci tejto periódy sa jednotlivé usadené kaly zmiešajú a 50 ml výsledného zloženého kalu sa pridá do každej jednotky.

Do kontrolnej jednotky sa pridá 95 ml sedimentu z odpadových vôd a 5 ml vody, do testovacích jednotiek sa pridá 95 ml sedimentu z odpadových vôd a 5 ml z vhodného zásobného roztoku testovanej látky (400 mg/liter). Znovu sa začne s prevzdušňovaním počas nasledujúcich 23 hodín. Kal sa nechá sedimentovať, supernatant sa odoberie a analyzuje sa obsah rozpusteného organického uhlíka (DOC).

Opísaný postup pridávania a odberov sa prevedie denne počas celého trvania testu.

Pred sedimentáciou je potrebné očistiť steny prevzdušňovacej jednotky, aby sa zabránilo akumulácii pevných častíc nad hladinou kvapaliny. V každej jednotke sa musí použiť iná škrabka alebo kefka, aby nedošlo ku prenosu kontaminácie medzi jednotkami.

V ideálnom prípade sa stanovuje obsah rozpusteného organického uhlíka (DOC) v supernatante denne, ale prípustné sú aj menej frekventované analýzy. Pred samotnou analýzou sa supernatant filtruje cez premyté 0,45 μm membránové filtre alebo sa scentrifuguje. Membránové filtre sú prípustné, ak je potvrdené, že sa z nich neuvoľňuje uhlík, alebo že nevyvolávajú adsorpciu pevných častíc počas filtrácie. Teplota vzorky počas centrifugácie nesmie presiahnuť 40 °C.

Dĺžka trvania testu pri látkach, ktoré vykazujú len malú alebo žiadnu biodegradáciu, nie je určená, ale skúsenosti naznačujú, že by to malo byť vo všeobecnosti aspoň 12 týždňov, ale nie dlhšie ako 26 týždňov.

## 2. ÚDAJE A PLATNOSŤ

Zistené hodnoty rozpusteného organického uhlíka (DOC) v supernatante testovacích aj kontrolných jednotiek sa vynesú do grafov v závislosti od času.

Pri dosiahnutí biodegradácie sa výsledky zistené v teste začnú približovať kontrolným výsledkom. Ak je v troch nasledujúcich meraniach zistený konštantný rozdiel medzi testovacími a kontrolnými jednotkami, vykoná sa už len taký počet meraní, aby bolo možné údaje štatisticky spracovať a vypočítať percento biodegradácie testovanej látky alebo prípravku ($D_{da}$ alebo $D_{ssd}$, pozri odsek 1.2).

3. **SPRÁVA**

3.1. **Správa z testu**

Správa z testu musí, ak je to možné, obsahovať tieto informácie:

— všetky informácie o type odpadových vôd, type použitých jednotiek, o experimentálnych výsledkoch zahŕňajúcich testovanú látku, referenčnú látku, ak bola použitá a slepú vzorku,

— teplotu,

— úbytkovú krivku aj s opisom, spôsob výpočtu (pozri 1.2),

— dátum a lokalita, kde boli odobraté vzorky aktivovaného kalu a odpadovej vody, stav adaptácie, koncentrácie atď.,

— vedecké odôvodnenie akýchkoľvek zmien v testovacej metóde,

— podpis a dátum.

3.2. **Interpretácia výsledkov**

Keďže látka testovaná danou metódou zvyčajne nie je ľahko biodegradovateľná, normálny úbytok organického uhlíka v dôsledku samotnej biodegradácie bude v priebehu dní až týždňov postupný, okrem tých prípadov, keď dôjde k náhlej aklimatizácii sprevádzanej rapídnym vymiznutím uhlíka po niekoľkých týždňoch.

Významnú úlohu zohráva však v niektorých prípadoch fyzikálno - chemická adsorpcia, čo sa dá indikovať na základe úplného alebo čiastočného úbytku rozpusteného organického uhlíka (DOC) pridaného na začiatku procedúry. Nasledujúci proces závisí od faktorov, ako sú stupeň adsorpcie alebo koncentrácia suspendovaných pevných častíc v odstránenom efluente. Zvyčajne sa rozdiel medzi koncentráciou rozpusteného organického uhlíka v kontrolnom a testovanom supernatante postupne zvyšuje z pôvodnej nízkej hodnoty a tento rozdiel sa potom udržuje na určitej novej hodnote po zbytok experimentu, pokiaľ nedôjde k aklimatizácii.

Pre zistenie rozdielu medzi biodegradáciou (alebo čiastočnou biodegradáciou) a adsorpciou je potrebné použiť ďalšie testy. Existuje viacero možných spôsobov, ale najvýhodnejšie je využiť supernatant alebo kal ako inokulum v základnej sade testov, pričom sa preferuje respirometrický test.

Testovaná látka, ktorá v teste vykazuje vysoký úbytok rozpusteného organického uhlíka, a to nie v dôsledku adsorpcie, sa považuje za potencionálne biodegradovateľnú. Čiastočný úbytok (nie v dôsledku adsorpcie) indikuje, že testovaná látka podlieha aspoň určitej obmedzenej biodegradácii.

Nízky alebo žiadny úbytok rozpusteného organického uhlíka môže byť spôsobený inhibíciou mikroorganizmov testovanou látkou. Dôkazom je lýza alebo strata kalu za tvorby zakaleného supernatantu. V tom prípade sa test môže zopakovať s použitím nižšej koncentrácie testovanej látky.

Vyššiu citlivosť poskytujú niektoré špecifické analytické metódy alebo použitie testovanej látky so značeným $^{14}C$ uhlíkom. V prípade značeného $^{14}C$ uhlíka v testovanej látke, sa uskutočnená biodegradácia potvrdzuje zachytením $^{14}CO_2$.

V prípade interpretácie výsledkov v zmysle primárnej biodegradácie by sa v rámci možností malo uviesť aj vysvetlenie zmien chemickej štruktúry, ktoré zabránili detekovať pôvodnú testovanú látku.

Spolu s výsledkami získanými v slepej vzorke (banku) musí byť uvedená aj validácia analytických metód.

4. **LITERATÚRA**

(1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 302 A*, Decision of the Council C(81) 30 final.

*Dodatok 1*

**Test SCAS: príklad výsledkov**

| Látka | $C_T$ (mg/l) | $C_T - C_C$ (mg/l) | % biodegradácie ($D_{dt}$) | Trvanie testu (dni) |
|---|---|---|---|---|
| 4-acetyl aminobenzén sulfonát | 17,2 | 2,0 | 85 | 40 |
| tetrapropylénbenzén sulfonát | 17,3 | 8,4 | 51,4 | 40 |
| 4-nitrofenol | 16,9 | 0,8 | 95,3 | 40 |
| dietylénglykol | 16,5 | 0,2 | 98,8 | 40 |
| anilín | 16,9 | 1,7 | 95,9 | 40 |
| cyklopentán tetrakarboxylát | 17,9 | 3,2 | 81,1 | 120 |

*Dodatok 2*

**Príklad testovacieho prístroja**

*Obrázok č. 1*

