Tento dokument slúži čisto na potrebu dokumentácie a inštitúcie nenesú nijakú zodpovednosť za jeho obsah

►**B**

NARIADENIE KOMISIE (ES) č. 440/2008

z 30. mája 2008,

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

(Text s významom pre EHP)

(Ú. v. EÚ L 142, 31.5.2008, s. 1)

Zmenené a doplnené:

		Úradný vestník		
		Č.	Strana	Dátum
►**M1**	Nariadenie Komisie (ES) č. 761/2009 z 23. júla 2009	L 220	1	24.8.2009
►**M2**	Nariadenie Komisie (EÚ) č. 1152/2010 z 8. decembra 2010	L 324	13	9.12.2010
►**M3**	Nariadenie Komisie (EÚ) č. 640/2012 zo 6. júla 2012	L 193	1	20.7.2012
►**M4**	Nariadenie Komisie (EÚ) č. 260/2014 z 24. januára 2014	L 81	1	19.3.2014

▼B

NARIADENIE KOMISIE (ES) č. 440/2008

z 30. mája 2008,

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

(Text s významom pre EHP)

KOMISIA EURÓPSKYCH SPOLOČENSTIEV,

so zreteľom na Zmluvu o založení Európskeho spoločenstva,

so zreteľom na nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 z 18. decembra 2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemických látok (REACH) a o zriadení Európskej chemickej agentúry, o zmene a doplnení smernice 1999/45/ES a o zrušení nariadenia Rady (EHS) č. 793/93 a nariadenia Komisie (ES) č. 1488/94, smernice Rady 76/769/EHS a smerníc Komisie 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES ([1]), a najmä na jeho článok 13 ods. 3,

keďže:

(1) Podľa nariadenia (ES) č. 1907/2006 sa testovacie metódy majú prijať na úrovni Spoločenstva na účely testovania látok v prípadoch, keď sa testovanie vyžaduje na získanie informácií o vlastnostiach látok.

(2) V prílohe V k smernici 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 ([2]) sa ustanovili metódy určovania fyzikálno-chemických vlastností, toxicity a ekotoxicity látok a prípravkov. Príloha V k smernici 67/548/EHS sa vypustila smernicou Európskeho parlamentu a Rady 2006/121/ES s účinnosťou od 1. júna 2008.

(3) Testovacie metódy uvedené v prílohe V k smernici 67/548/EHS by sa mali do tohto nariadenia zahrnúť.

(4) Týmto nariadením sa nevylučuje použitie iných testovacích metód za predpokladu, že sú v súlade s článkom 13 ods. 3 nariadenia (ES) č. 1907/2006.

([1]) Ú. v. EÚ L 396, 30.12.2006, s. 1, opravená verzia v Ú. v. EÚ L 136, 29.5.2007, s. 3.

([2]) Ú. v. ES 196, 16.8.1967, s. 1. Smernica naposledy zmenená a doplnená smernicou Európskeho parlamentu a Rady 2006/121/ES (Ú. v. ES L 396, 30.12.2006, s. 850, opravená verzia v Ú. v. EÚ L 136, 29.5.2007, s. 281) – *príslušné odkazy sa budú aktualizovať, keď sa zverejní 30. ATP.*

▼B

(5) Pri vypracovávaní testovacích metód by sa mali v plnej miere zohľadňovať zásady nahradenia, obmedzenia a zdokonalenia využívania zvierat v postupoch, predovšetkým vtedy, keď sú k dispozícii schválené metódy, ktorými sa testovanie na zvieratách môže nahradiť, obmedziť alebo zdokonaliť.

(6) Ustanovenia tohto nariadenia sú v súlade so stanoviskom výboru zriadeného podľa článku 133 nariadenia (ES) č. 1907/2006,

PRIJALA TOTO NARIADENIE:

Článok 1

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

Článok 2

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

Článok 3

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

Článok 4

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

Uplatňuje sa od 1. júna 2008.

▼B

PRÍLOHA

ČASŤ A: METÓDY NA STANOVENIE FYZIKÁLNO-CHEMICKÝCH VLASTNOSTÍ

OBSAH

A.1. TEPLOTA TOPENIA A TUHNUTIA

A.2. TEPLOTA VARU

A.3. RELATÍVNA HUSTOTA

A.4. TLAK PARY

A.5. POVRCHOVÉ NAPÄTIE

A.6. ROZPUSTNOSŤ VO VODE

A.8. ROZDEĽOVACÍ KOEFICIENT

A.9. TEPLOTA VZPLANUTIA

A.10. HORĽAVOSŤ (TUHÉ LÁTKY)

A.11. HORĽAVOSŤ (PLYNY)

A.12. HORĽAVOSŤ (KONTAKT S VODOU)

A.13. SAMOZÁPALNÉ VLASTNOSTI TUHÝCH LÁTOK A KVAPALÍN

A.14. VÝBUŠNÉ VLASTNOSTI

A.15. TEPLOTA SAMOVZNIETENIA (KVAPALINY A PLYNY)

A.16. RELATÍVNA TEPLOTA SAMOVZNIETENIA PRE TUHÉ LÁTKY

A.17. OXIDAČNÉ VLASTNOSTI (TUHÉ LÁTKY)

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

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

A.20. ROZPÚŠŤACIE/EXTRAKTÍVNE VLASTNOSTI POLYMÉROV VO VODE

A.21. OXIDAČNÉ VLASTNOSTI (KVAPALINY)

A.22. DĹŽKOVÁ HODNOTA GEOMETRICKÉHO VYJADRENIA PRIEMERU VLÁKEN

▼M4

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

▼B

A.1. TEPLOTA TOPENIA A TUHNUTIA

1. METÓDA

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

1.1. ÚVOD

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

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

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

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

1.2. POJMY A JEDNOTKY

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

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

Prepočítavanie jednotiek (K na ^{o}C)

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

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

T: termodynamická teplota, kelvin (K)

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

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

Niektoré kalibračné látky sú uvedené v odkazoch (4).

▼B

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

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

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

1.4.1. **Kapilárna metóda**

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

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

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

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

1.4.1.3. *Fotočlánková detekcia*

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

1.4.2. **Tepelné bloky**

1.4.2.1. *Koflerov tepelný blok*

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

▼B

1.4.2.2. *Mikroskop na sledovanie taveniny*

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

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

1.4.2.3. *Menisková metóda*

Táto metóda sa používa špeciálne pre polyamidy.

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

1.4.3. **Metóda na stanovenie teploty tuhnutia**

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

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

1.4.4. **Tepelná (termická) analýza**

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

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

▼B

1.4.4.2. *Diferenciálna snímacia kalorimetria (DSK)*

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

1.4.5. **Teplota tuhnutia olejov**

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

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

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

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

TABUĽKA: POUŽITEĽNOSŤ METÓD

A. **Kapilárne metódy**

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

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

▼B

B. **Vyhrievacie bloky a metódy tuhnutia**

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

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

C. **Tepelná (termická) analýza**

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

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

D. **Teplota tuhnutia olejov**

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

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

1.6. OPIS METÓD

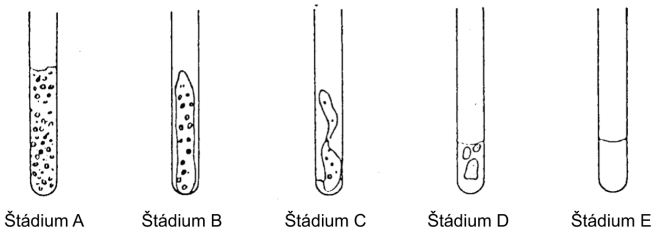
Postupy skoro všetkých skúšobných metód sú opísané v medzinárodných a štátnych normách (pozri dodatok 1).

1.6.1. **Metódy s kapilárnou rúrkou**

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

▼B

Obrázok 1



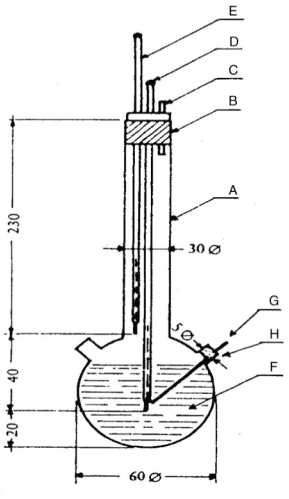
Štádium A	(začiatok procesu topenia): Jemné kvapôčky rovnomerne priliehajú k vnútornej stene kapilárnej rúrky.
Štádium B	Medzi testovanou vzorkou a vnútornou stenou kapilárnej rúrky sa objavuje voľný priestor následkom zmrašťovania taveniny.
Štádium C	Zmraštená testovaná vzorka sa začína zosúvať nadol a skvapalnieva.
Štádium D	Na povrchu sa vytvára úplný meniskus, avšak značné množstvo testovanej vzorky zostáva naďalej v tuhom skupenstve.
Štádium E	(konečné štádium procesu topenia): V kapilárnej rúrke už nemožno sledovať žiadne tuhé čiastočky.

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

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

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

Obrázok 2



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

▼B

Temperačná kvapalina:

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

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

Teplomer:

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

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

Postup:

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

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

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

Výpočet:

Výpočet teploty topenia je takýto:

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

kde:

T = korigovaná teplota topenia v K

T_D = teplota odčítaná na teplomere D v K

T_E = teplota odčítaná na teplomere E v K

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

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

Prístroje:

Pozostávajú z týchto častí:

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

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

▼B

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

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

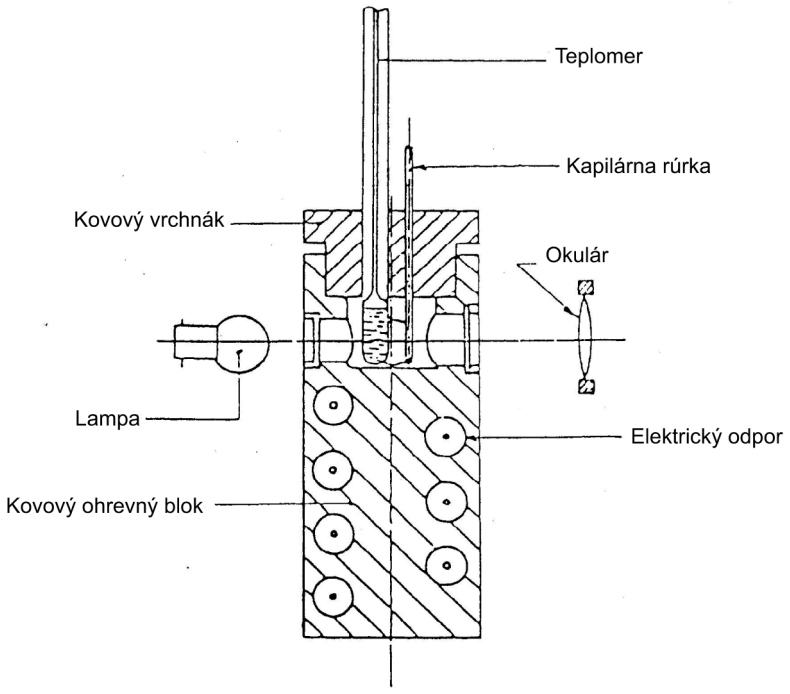
— štyri okienka zo žiaruvzdorného skla na bočných stenách komory, ktoré sú umiestnené protiľahlo a vzájomne v pravých uhloch. Pred jedným z týchto okienok je namontovaný okulár na sledovanie kapilárnej rúrky. Zvyšné tri okienka sa používajú na osvetlenie vnútornej komory kovového bloku pomocou lámp,

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

Teplomer:

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

Obrázok 3



1.6.1.3. *Fotočlánková (fotónková) detekcia*

Prístroje a postup:

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

▼B

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

1.6.2. **Tepelné bloky**

1.6.2.1. *Koflerov tepelný blok*

Pozri dodatok.

1.6.2.2. *Mikroskop na sledovanie taveniny*

Pozri dodatok.

1.6.2.3. *Menisková metóda (polyamidy)*

Pozri dodatok.

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

1.6.3. **Metódy na stanovenie teploty tuhnutia**

Pozri dodatok.

1.6.4. **Tepelná analýza**

1.6.4.1. *Diferenciálna tepelná analýza*

Pozri dodatok.

1.6.4.2. *Diferenciálna snímacia kalorimetria*

Pozri dodatok.

1.6.5. **Stanovenie teploty tuhnutia olejov**

Pozri dodatok.

2. **ÚDAJE**

V niektorých prípadoch je potrebná korekcia teplomeru.

3. **SPRÁVA**

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

— použitú metódu,

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

— stanovenie presnosti.

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

▼B

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

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

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

4. **ODKAZY**

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

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

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

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

▼B

Dodatok

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

1. **Kapilárne metódy**

1.1. Zariadenia na stanovenie teploty topenia s kvapalným kúpeľom

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

1.2. Zariadenia na stanovenie teploty topenia s kovovým blokom

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

2. **Tepelné bloky**

2.1. Koflerov tepelný blok

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

2.2. Mikroskop na sledovanie tavenín

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen.

2.3. Menisková metóda (polyamidy)

ISO 1218 (E)	Plastics- polyamides -determination of „melting point“

▼B

ANSI/ASTM D 2133-66	Standard specification for acetal resin injection moulding and extrusion materials
NF T 51-050	Résines de polyamides. Détermination du „point de fusion“ méthode du ménisque

3. **Metódy na stanovenie teploty tuhnutia**

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

4. **Tepelná analýza**

4.1. Diferenciálna tepelná analýza

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis

▼B

ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

4.2. Diferenciálna snímacia kalorimetria

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

5. **Stanovenie teploty tuhnutia olejov**

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

▼B

A.2. TEPLOTA VARU

1. METÓDA

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

1.1. ÚVOD

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

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

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

Poznámky:

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

1.2. POJMY A JEDNOTKY

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

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

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

kde:

P = tlak pary testovanej látky v pascaloch

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

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

T = termodynamická teplota v K

Teplota varuje stanovená pri zohľadnení okolitého tlaku pôsobiaceho počas merania.

▼B

Prepočty

Tlak (jednotky: kPa)

100kPa = 1 bar = 0,1 MPa

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

133 Pa = 1 mm Hg = 1 Torr

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

1 atm = štandardná atmosféra = 101 325 Pa

(jednotka „atm“ nie je prípustná).

Teplota (jednotky K – kelvin)

$t = T - 273,15$

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

T: termodynamická teplota, kelvin (K).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

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

Niektoré kalibračné látky možno vyhľadať v metódach uvedených v dodatku.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

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

1.4.1. **Stanovenie použitím ebuliometra**

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

1.4.2. **Dynamická metóda**

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

1.4.3. **Destilačná metóda pre teplotu varu**

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

▼B

1.4.4. **Metóda podľa Siwoloboffa**

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

1.4.5. **Fotočlánková detekcia**

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

1.4.6. **Diferenciálna tepelná analýza**

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

1.4.7. **Diferenciálna snímacia kalorimetria**

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

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

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

Tabuľka 1

Porovnanie metód

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

(1) Táto presnosť platí len pre jednoduchý prístroj opísaný napr. v norme ASTM D 1120-72; môže byť zlepšená použitím dokonalejšieho ebuliometra.
(2) Platí len pre čisté látky. Použitie za iných okolností by malo byť zdôvodnené.

▼B

1.6. OPIS SKÚŠOBNÝCH METÓD

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

1.6.1. **Ebuliometer**

Pozri dodatok.

1.6.2. **Dynamická metóda**

Pozri testovaciu metódu A.4 na stanovenie tlaku pary.

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

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

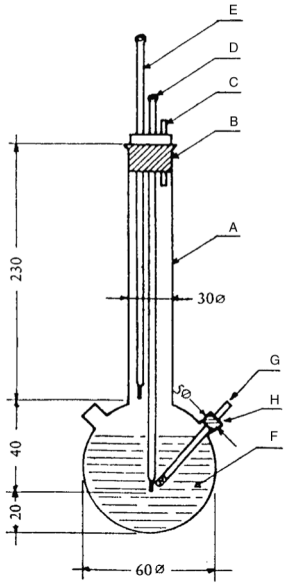
Pozri dodatok.

1.6.4. **Metóda podľa Siwoloboffa**

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

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

Obrázok 1



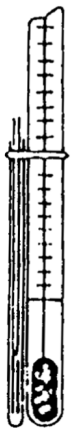
A: Meracia náboda
B: Zátka
C: Ventil
D: Teplomer
E: Prídavný teplomer
F: Kúpeľová kvapalina
G: Kapilárna rúrka vyrobená zo skla o dĺžke 80 – 100 mm, s vnútorným priemerom približne 1 mm, s maximálnym vonkajším priemerom 5 mm a s hrúbkou steny 0,2 – 0,3 mm
H: Bočná rúrka

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

▼B

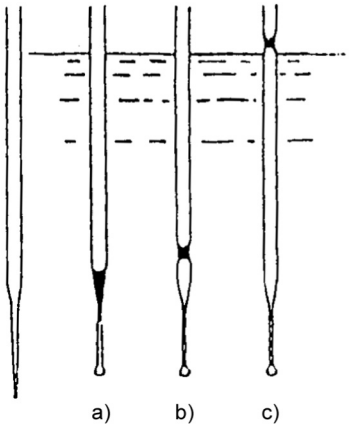
Obrázok 2

Princíp podľa Siwoloboffa



Obrázok 3

Modifikovaný princíp



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

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

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

1.6.5. **Fotočlánková detekcia**

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

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

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

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

▼B

1.6.6. **Tepelná analýza**

1.6.6.1. *Diferenciálna tepelná analýza*

Pozri dodatok.

1.6.6.2. *Diferenciálna snímacia kalorimetria*

Pozri dodatok.

2. **ÚDAJE**

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

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

kde:

Δp = (101,325 – p) [pozor na znamienko!]

P = meranie tlaku v kPa

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

T = nameraná teplota varu v K

T_n = teplota varu korigovaná k normálnemu tlaku v K

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

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

Tabuľka 2

Opravné koeficienty f_T na teplotu

Teplota T (K)	Opravný koeficient f_T (K/kPa)
323,15	0,26
348,15	0,28
373,15	0,31
398,15	0,33
423,15	0,35
448,15	0,37
473,15	0,39
498,15	0,41
523,15	0,44
548,15	0,45
573,15	0,47

▼B

3. **SPRÁVA**

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

— použitú metódu,

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

— odhad presnosti.

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

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

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

4. **ODKAZY**

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

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

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

▼B

Dodatok

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

1. **Ebuliometer**

1.1. Zariadenia na stanovenie teploty topenia s kvapalným kúpeľom

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

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

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

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

ASTM E 537-76	Standard method for assessing the thermal stability of chemicals by methods of differential thermal analysis
ASTM E 473-85	Standard definitions of terms relating to thermal analysis
ASTM E 472-86	Standard practice for reporting thermoanalytical data
DIN 51005	Thermische Analyse, Begriffe

▼B

A.3. RELATÍVNA HUSTOTA

1. METÓDA

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

1.1. ÚVOD

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

1.2. POJMY A JEDNOTKY

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

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

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

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY (1) (3)

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

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNÝCH METÓD

Používajú sa štyri triedy (skupiny) skúšobných metód.

1.4.1. **Výtlačné metódy**

1.4.1.1. *Hustomer* (pre kvapalné látky)

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

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

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

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

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

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

▼B

1.4.2. **Pyknometrické metódy**

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

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

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

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

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

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

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

1.6. OPIS METÓD

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

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

2. **ÚDAJE**

Pozrite príslušné technické normy uvedené v dodatku.

3. **SPRÁVA**

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

— použitú metódu,

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

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

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

▼B

Tabuľka

Použiteľnosť metód

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

4. **ODKAZY**

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

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

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

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

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

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

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

▼B

Dodatok

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

1. **Výtlačné metódy**

1.1. Hydrometer

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

1.2. Hydrostatické váhy

Pre tuhé látky

ISO 1183	Method A: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
NF T 20-049	Chemical products for industrial use – Determination of the density of solids other than powders and cellular products – Hydrostatic balance method
ASTM-D-792	Specific gravity and density of plastics by displacement
DIN 53479	Testing of plastics and elastomers; determination of density

Pre kvapalné látky

ISO 901	ISO 758

▼B

DIN 51757	Testing of mineral oils and related materials; determination of density
ASTM D 941-55, ASTM D 1296-67 and ASTM D 1481-62	
ASTM D 1298	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method
BS 4714	Density, specific gravity or API gravity of crude petroleum and liquid petroleum products by hydrometer method

1.3. Metóda ponoreného telesa

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

2. **Pyknometrické metódy**

2.1. Pre kvapalné látky

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

▼B

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

▼B

2.2. Pre tuhé látky

ISO 1183	Method B: Methods for determining the density and relative density of plastics excluding cellular plastics
NF T 20-053	Chemical products for industrial use – Determination of density of solids in powder and liquids – Pyknometric method
DIN 19683	Determination of the density of soils

3. **Vzduchový porovnávací pyknometer**

DIN 55990	Part 3: Prüfung von Anstrichstoffen und ähnlichen Beschichtungsstoffen; Pulverlack; Bestimmung der Dichte
DIN 53243	Anstrichstoffe; Chlorhaltige Polymere; Prüfung

▼M1

A.4. Tlak pary

1. METÓDA

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

1.1. ÚVOD

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

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

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

1.2. POJMY A JEDNOTKY

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

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

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

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

1 bar = 10^5 Pa

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

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

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

▼**M1**

Tabuľka 1

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

(1) Pri použití kapacitného manometra.

1.3. PRINCÍP TESTU

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

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

kde:

p = tlak pary látky vyjadrený v pascaloch

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

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

T = teplota v K (v kelvinoch).

▼**M1**

1.4. REFERENČNÉ LÁTKY

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

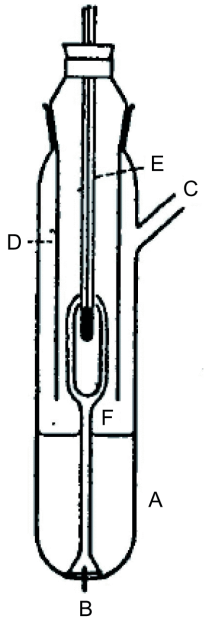
1.5. OPIS METÓDY

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

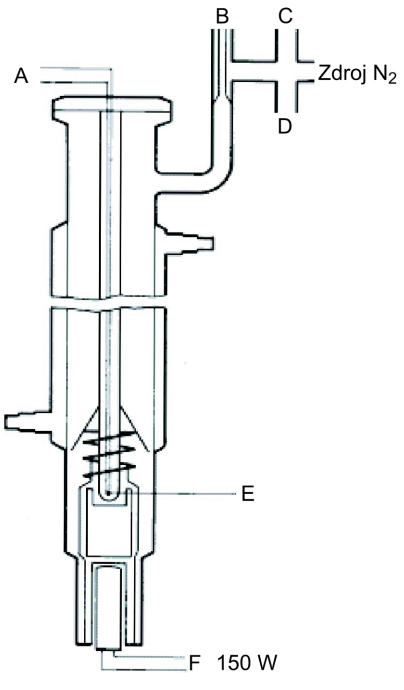
1.5.1.1. *Princíp*

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

Obrázok 1



Obrázok 2



▼**M1**

Cottrellova pumpa (4)

A: Termočlánok

B: Objem na vyrovnávanie vákua

C: Manometer

D: Vákuum

E: Miesto merania

F: Ohrievací článok približne 150 W

1.5.1.2. *Prístroje*

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

1.5.1.3. *Postup*

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

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

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

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

1.5.2. **Statická metóda**

1.5.2.1. *Princíp*

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

▼**M1**

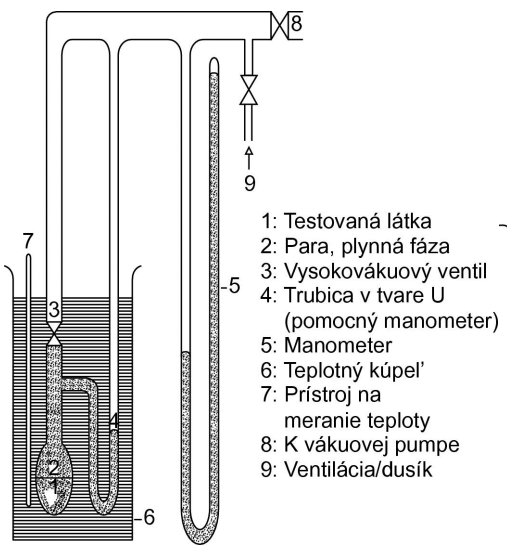
1.5.2.2. *Prístroje*

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

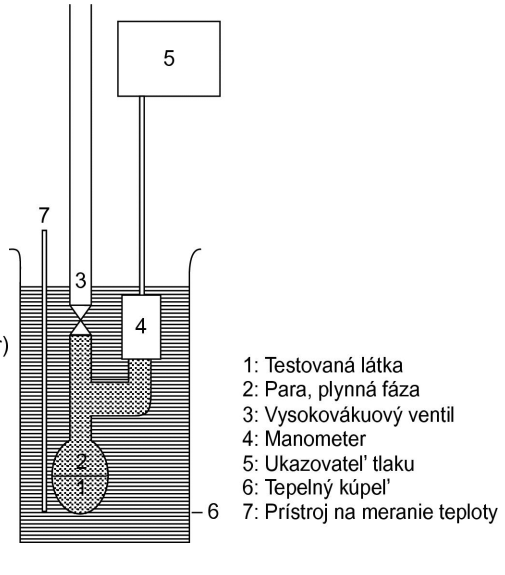
1.5.2.3. *Postup*

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

Obrázok 3a



Obrázok 3b



▼**M1**

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

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

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

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

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

1.5.3. **Metóda s s použitím izoteniskopu**

1.5.3.1. *Princíp*

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

1.5.3.2. *Prístroje*

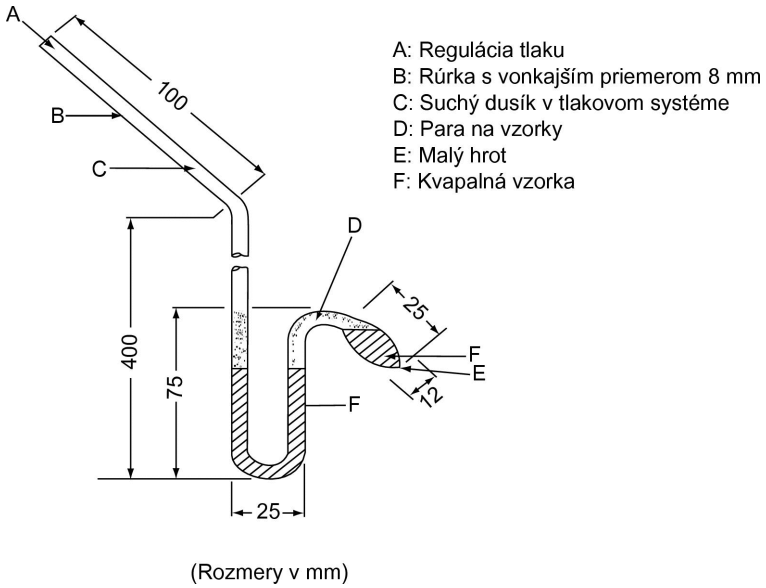
Príklad meracieho prístroja je znázornený na obrázku 4. Úplný opis možno nájsť v ASTM D 2879 – 86 (6).

▼**M1**

1.5.3.3. *Postup*

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

Obrázok 4



(Rozmery v mm)

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

▼M1

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

1.5.4.1. *Princíp*

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

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

kde:

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

M = mólová hmotnosť (g mol^{-1})

T = teplota (K)

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

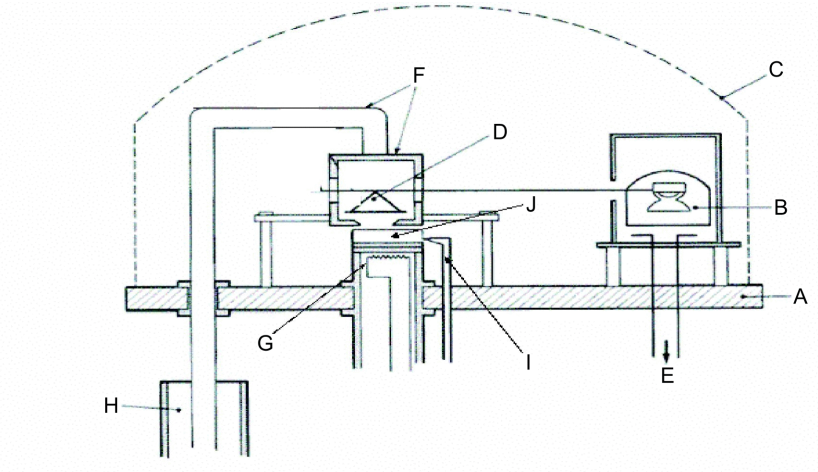
P = tlak pary (Pa)

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

1.5.4.2. *Prístroje*

Všeobecný princíp prístroja je znázornený na obrázku 5.

Obrázok 5



A: Podložka

B: Pohyblivá cievka

C: Vákuový zvon

D: Váhy s miskou

E: Vákuový merací prístroj

F: Chladiaci box a chladiaca tyč

G: Odparovacia piecka

H: Dewarova nádoba s tekutým dusíkom

I: Meranie teploty vzorky

J: Testovaná látka

▼**M1**

1.5.5. **Výtoková metóda: Knudsenova komôrka**

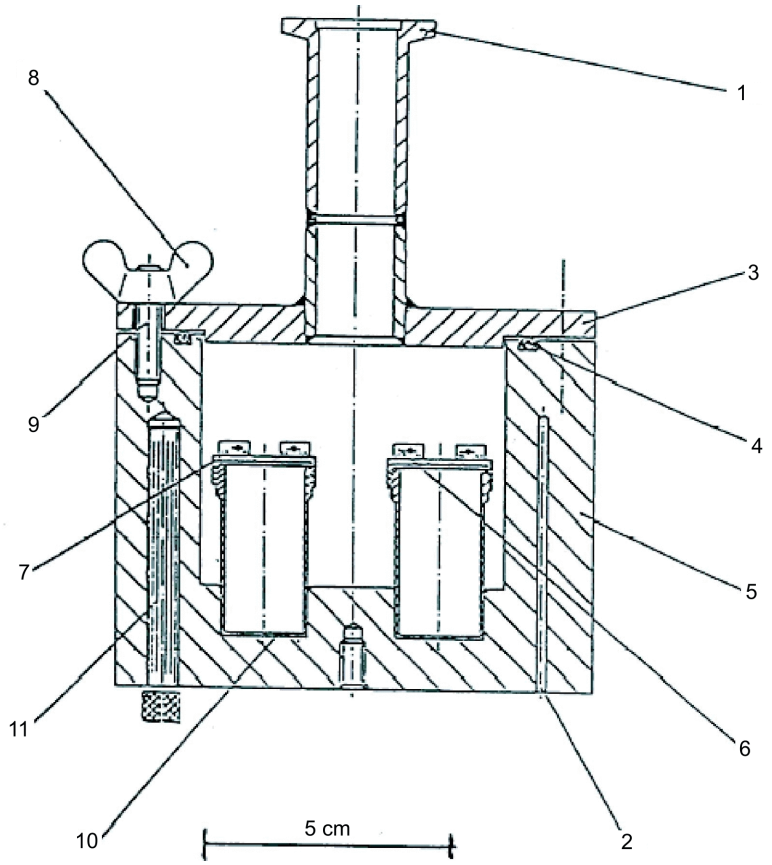
1.5.5.1. *Princíp*

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

1.5.5.2. *Prístroje*

Všeobecný princíp prístroja je znázornený na obrázku 6.

Obrázok 6



1: Pripojenie na vákuum

2: Dutina na zasunutie platinového odporového teplomera alebo na meranie a reguláciu teploty

3: Veko vákuovej nádoby

4: Tesniaci O-krúžok

5: Hliníková vákuová nádoba

6: Zariadenie na inštalovanie a vyberanie efúznych komôr

7: Veko so závitom

8: Krídlové matice

9: Svorníky

10: Efúzne komôrky z nehrdzavejúcej ocele

11: Ohrievacie teleso

▼M1

1.5.6. **Výtoková metóda: izotermálna termogravimetria**

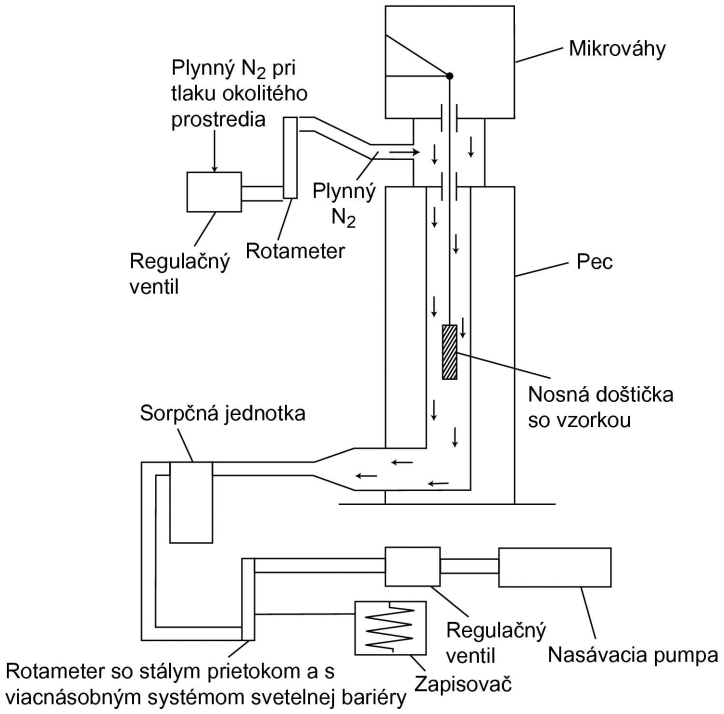
1.5.6.1. *Princíp*

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

1.5.6.2. *Prístroje*

Všeobecný princíp experimentálnej zostavy je znázornený na obrázku 7.

Obrázok 7



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

1.5.6.3. *Postup*

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

▼M1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5.7.1. *Princíp*

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

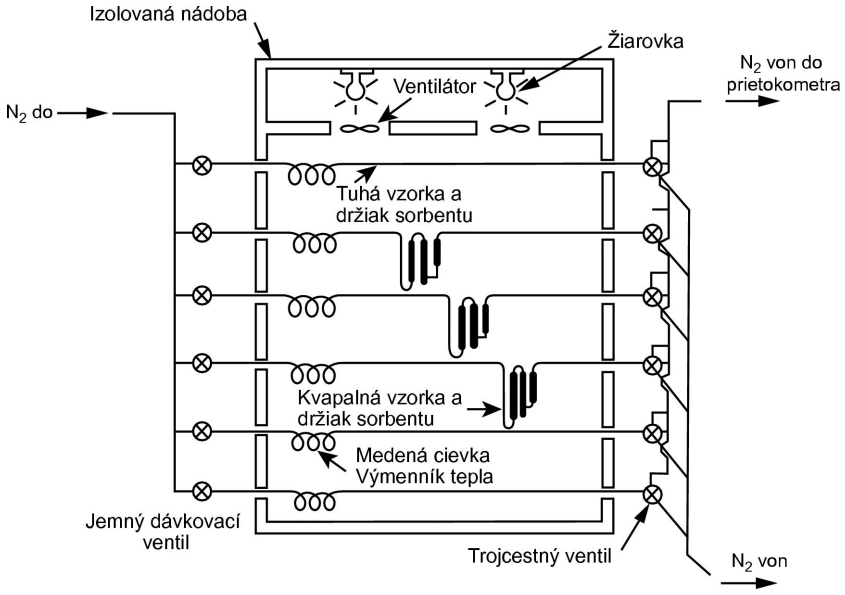
Postup plynovej saturácie možno použiť na tuhé alebo kvapalné látky. Môže sa použiť pre tlaky pár až do 10^{-10} Pa (10) (11) (12) (13) (14). Metóda je najspoľahlivejšia pre tlaky pár nižšie ako 10^3 Pa. Pre vyššie tlaky pár ako 10^3 Pa sú obvykle nadhodnotené pravdepodobne kvôli vytváraniu aerosólu.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

1.5.7.2. *Prístroje*

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

▼**M1**

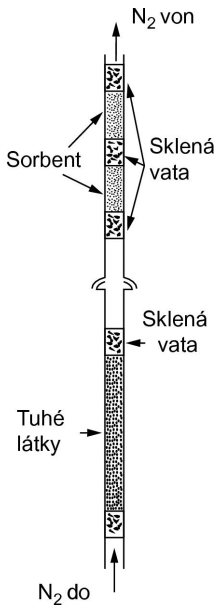
Obrázok 8



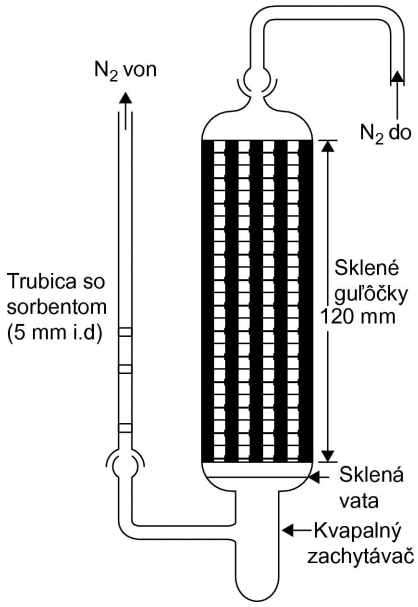
Vo všeobecnosti sa ako inertný nosný plyn používa dusík, ale príležitostne sa môže vyžadovať aj použitie iného plynu (24). Nosný plyn musí byť suchý. Prúd plynu sa rozdelí do 6 prúdov regulovaných ihlovými ventilmi (otvor približne 0,79 mm) a prúdi do nádoby cez medenú trubicu s vnútorným priemerom 3,8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

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

Obrázok 9



Obrázok 10



▼M1

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

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

1.5.7.3. *Postup*

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

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

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

Tlak pary sa vypočíta na základe rovnice:

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

kde:

p = tlak pary (Pa)

W = hmotnosť odparenej testovanej látky (g)

V = objem nasýteného plynu (m^3)

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

T = teplota (K)

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

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

▼M1

1.5.8. **Rotujúca guľôčka**

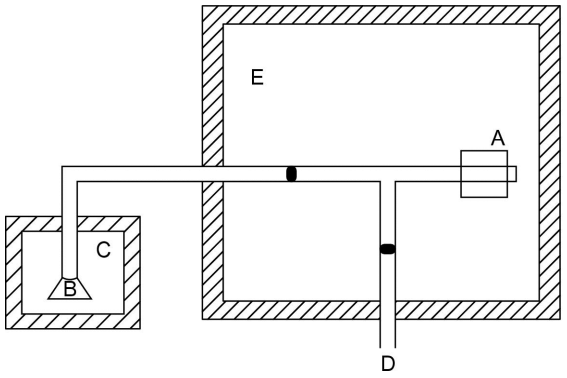
1.5.8.1. *Princíp*

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

1.5.8.2. *Prístroje*

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

Obrázok 11



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

2. **ÚDAJE A SPRÁVY**

2.1. ÚDAJE

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

2.2. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

— použitú metódu,

▼M1

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

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

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

— všetky pôvodné údaje,

— log p verzus 1/T krivka,

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

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

— charakter zmeny,

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

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

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

3. POUŽITÁ LITERATÚRA

1. Úradný vestník Európskych spoločenstiev L 383A, s. 26 – 47 (1992).

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

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

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

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

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

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

▼M1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼**M1**

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

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

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

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

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

▼M1

Dodatok

Metóda odhadu

ÚVOD

Predbežne vypočítané hodnoty tlaku pary sa môžu použiť na:

— rozhodnutie, ktorá z existujúcich pokusných metód je najvhodnejšia,

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

METÓDA ODHADU

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

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

POSTUP VÝPOČTU

Tlak pary sa vypočíta takto:

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

kde:

T = daná teplota

T_b = normálny bod varu

P_{VP} = tlak pary pri teplote T

ΔH_{Vb} = výparné teplo

ΔZ_b = koeficient stlačiteľnosti (odhadovaný pri 0,97)

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

Ďalej

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

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

▼**M1**

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

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

kde T_1 je bod varu pri zníženom tlaku P_1.

SPRÁVA

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

POUŽITÁ LITERATÚRA

(a) Watson, K.M. (1943). Ind. Eng. Chem, 35, 398.

(b) Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H. (1982). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill.

(c) OECD Environmental Monograph No.67. Application of Structure-Activity Relationships to the Estimation of Properties Important in Exposure Assessment (1993).

▼B

A.5. POVRCHOVÉ NAPÄTIE

1. METÓDA

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

1.1. ÚVOD

Opísané metódy sú určené na meranie povrchového napätia vodných roztokov.

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

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

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

1.2. POJMY A JEDNOTKY

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

Povrchové napätie sa udáva ako:

N/m (jednotka SI) alebo

mN/m (podjednotka SI)

1 N/m = 10^3 dyn/cm

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

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

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

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

1.4. PRINCÍP METÓD

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

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

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

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

▼B

1.6. OPIS METÓD

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

1.6.1. **Doštičková metóda**

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

1.6.2. **Strmienková metóda**

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

1.6.3. **Krúžková metóda**

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

1.6.4. **Harmonizovaná krúžková metóda podľa OECD**

1.6.4.1. *Prístroje*

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

— pohyblivá doska na vzorky,

— systém na meranie sily,

— meracie teleso (krúžok),

— meracia nádoba.

1.6.4.1.1. Pohyblivá doska na vzorky

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

1.6.4.1.2. Systém na meranie sily

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

▼B

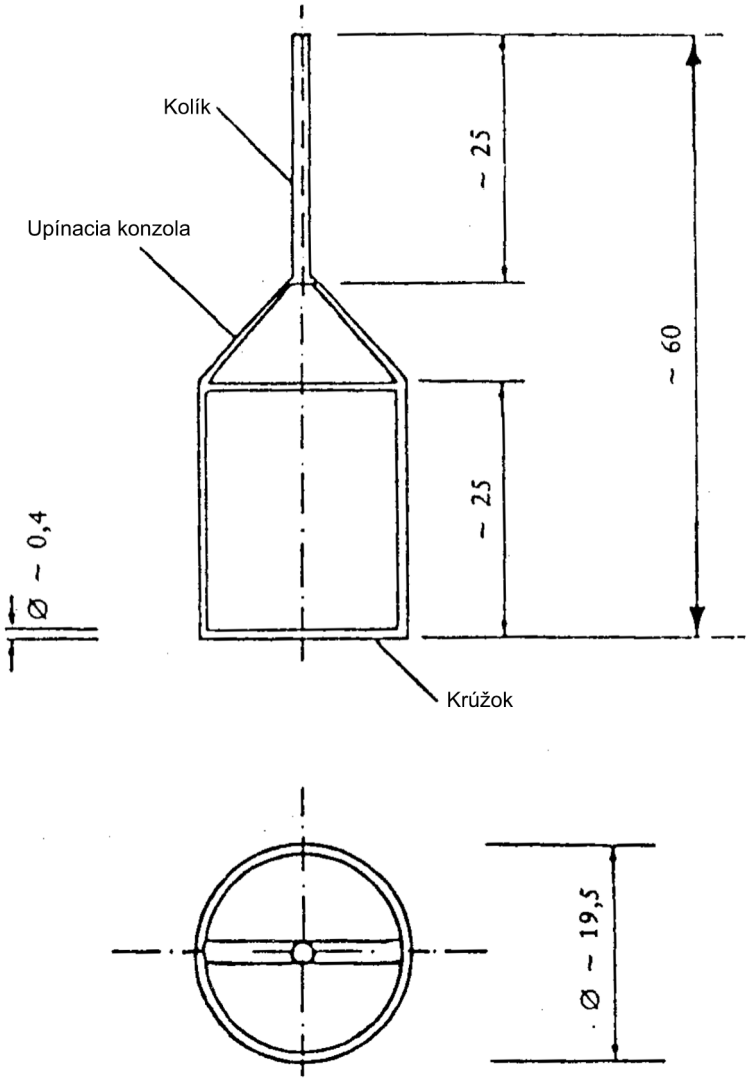
1.6.4.1.3. Meracie teleso (krúžok)

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

Obrázok

Meracie teleso (krúžok)

(Všetky rozmery sú vyjadrené v milimetroch)



1.6.4.1.4. Meracia nádoba

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

▼B

1.6.4.2. *Príprava prístroja*

1.6.4.2.1. Čistenie

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

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

Upozornenie:

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

1.6.4.2.2. Kalibrácia prístroja

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

Inštalácia:

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

Nastavenie nulového bodu:

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

Kalibrácie:

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

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

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

kde:

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

m = hmotnosť závažia (g)

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

b = stredný obvod krúžku (cm)

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

▼B

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

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

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

kde:

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

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

1.6.4.3. *Príprava vzoriek*

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

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

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

1.6.5. **Podmienky skúšania**

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

1.6.6. **Realizácia testu**

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

▼B

2. **ÚDAJE**

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

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

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

Tabuľka

Korekcia nameraného povrchového napätia

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

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

Experimentálna hodnota (mN/m)	Korigovaná hodnota (mN/m}	
	Kalibrácia závažiami [pozri bod 1.6.4.2.2 písm. a)]	Kalibrácia vodou [pozri bod 1.6.4.2.2 písm. b)
20	16,9	18,1
22	18,7	20,1
24	20,6	22,1
26	22,4	24,1
28	24,3	26,1
30	26,2	28,1
32	28,1	30,1
34	29,9	32,1
36	31,8	34,1
38	33,7	36,1
40	35,6	38,2
42	37,6	40,3
44	39,5	42,3
46	41,4	44,4
48	43,4	46,5
50	45,3	48,6
52	47,3	50,7
54	49,3	52,8
56	51,2	54,9

▼B

Experimentálna hodnota (mN/m)	Korigovaná hodnota (mN/m}	
	Kalibrácia závažiami [pozri bod 1.6.4.2.2 písm. a)]	Kalibrácia vodou [pozri bod 1.6.4.2.2 písm. b)
58	53,2	57,0
60	55,2	59,1
62	57,2	61,3
64	59,2	63,4
66	61,2	65,5
68	63,2	67,7
70	65,2	69,9
72	67,2	72,0
74	69,2	—
76	71,2	—
78	73,2	—

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

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

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

kde:

F = sila nameraná na dynamometri v bode prerušenia filmu

R = polomer krúžku

f = korekčný (opravný) koeficient (1)

3. **SPRÁVA**

3.1. SPRÁVA Z TESTU

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

— použitú metódu,

— typ použitej vody alebo roztoku,

— presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímesi),

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

▼B

— koncentráciu roztoku,

— testovaciu teplotu,

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

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

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

3.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

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

4. **ODKAZY**

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

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

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

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

▼M4

A.6. **ROZPUSTNOSŤ VO VODE**

ÚVOD

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

ÚVODNÉ ÚVAHY

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

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

POJMY A JEDNOTKY

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

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

REFERENČNÉ CHEMIKÁLIE

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

OPIS METÓD

Podmienky testovania

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

Predbežný test

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

▼M4

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

Tabuľka 1

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

Metóda vypierania z kolóny

Princíp

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

Vybavenie

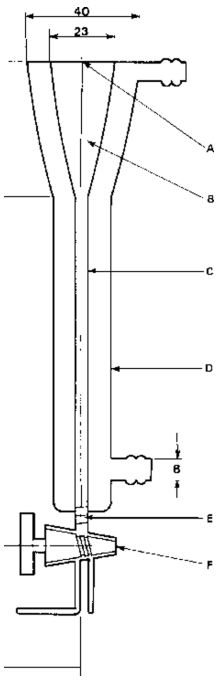
10. Vybavenie pozostáva z mikrokolóny (obrázok 1), ktorá sa udržiava pri konštantnej teplote. Je spojené buď s recirkulačným čerpadlom (obrázok 2), alebo s egalizačnou nádobou (obrázok 3). Mikrokolóna obsahuje inertný nosný materiál, ktorý na mieste drží malá zátka zo sklenej vaty, ktorá slúži aj na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

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

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

▼**M4**

Obrázok 1



Rozmery v mm

A. Prípojka pre zabrúsenú sklenenú spojku

B. Uzavretý priestor nad kvapalinou

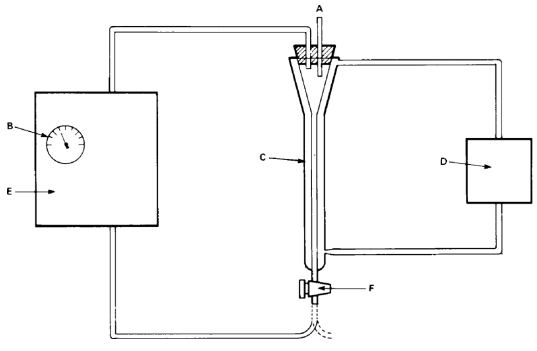
C. Vnútorná časť 5

D. Vonkajšia časť 19

E. Zátka zo sklenej vaty

F. Uzatvárací ventil

Obrázok 2



A. Vyrovnávanie tlaku vzduchom

B. Prietokomer

C. Mikrokolóna

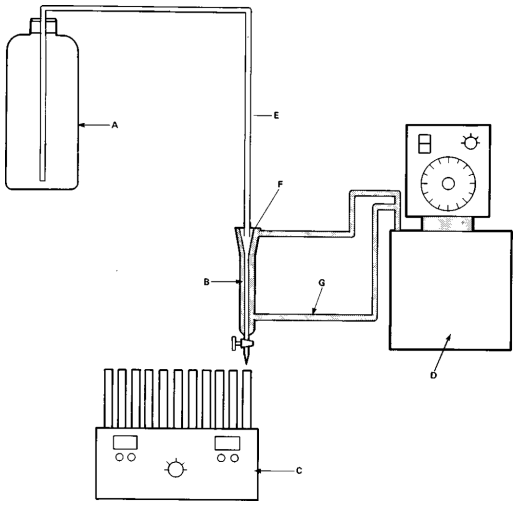
D. Termostaticky kontrolované cirkulačné čerpadlo

E. Recirkulačné čerpadlo

F. Dvojcestný ventil pre vzorkovanie

▼M4

Obrázok 3



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

B. Kolóna

C. Frakčný akumulátor

D. Termostat

E. Teflónová rúrka

F. Zabrúsená sklenená spojka

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

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

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

Postup s využitím recirkulačného čerpadla

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

▼M4

Postup s využitím egalizačnej nádoby

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

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

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

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

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

Banková metóda

Princíp

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

Vybavenie

22. Je potrebný tento materiál:

— normálne laboratórne sklené nádoby a vybavenie laboratórnymi prístrojmi,

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

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

— analytické vybavenie.

Postup

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

▼M4

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

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

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

Analytické stanovenie

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

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

Metóda vypierania z kolóny

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

Banková metóda

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

Správa o teste

Metóda vypierania z kolóny

29. Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

— výsledky predbežného testu,

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

— koncentrácie, prietoky a pH pre každú vzorku,

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

— priemer dvoch za sebou nasledujúcich kôl meraní,

— teplota vody počas saturačného procesu,

— metóda analýzy,

— charakteristické vlastnosti nosného materiálu,

— spôsob aplikácie testovanej látky na nosný materiál,

— druh použitého riedidla,

— dôkazy akejkoľvek chemickej nestálosti látky počas testu,

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

▼M4

Banková metóda

30. Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

— výsledky predbežného testu,

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

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

— pH každej vzorky,

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

— testovacia teplota,

— analytická metóda,

— dôkazy akejkoľvek chemickej nestálosti látky počas testu,

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

LITERATÚRA

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

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

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

▼B

A.8. ROZDEĽOVACÍ KOEFICIENT

1. METÓDA

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

1.1. ÚVOD

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

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

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

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

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

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

1.2. POJMY A JEDNOTKY

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

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

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

▼B

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Metóda trepačkovej banky

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

Metóda HPLC

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

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

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

1.4. PRINCÍP METÓDY

1.4.1. **Metóda trepačkovej banky**

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

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

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

▼B

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

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

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

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

1.5.1. **Opakovateľnosť**

Metóda trepačkovej banky

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

Metóda HPLC (vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie)

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

1.5.2. **Citlivosť**

Metóda trepačkovej banky

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

Metóda HPLC (vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie)

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

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

▼B

1.5.3. **Špecifickosť**

Metóda trepačkovej banky

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

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

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

1.6. OPIS METÓDY

1.6.1. **Predbežný odhad rozdeľovacieho koeficientu**

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

1.6.2. **Metóda trepačkovej banky**

1.6.2.1. *Príprava*

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

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

Upozornenie:

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

1.6.2.1.1. Predsaturácia rozpúšťadiel

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

▼B

1.6.2.1.2. Príprava na test

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

— predbežným odhadom rozdeľovacieho koeficientu (pozri vyššie),

— minimálnym množstvom testovanej látky potrebným pre analytický postup a

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

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

1.6.2.1.3. Testovaná látka

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

1.6.2.2. *Podmienky skúšania*

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

1.6.2.3. *Postup merania*

1.6.2.3.1. Vytvorenie rozdeľovacej rovnováhy

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

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

1.6.2.3.2. Oddeľovanie fáz odstreďovaním

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

▼B

1.6.2.4. *Analýza*

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

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

— fotometrické metódy,

— plynová chromatografia,

— vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC).

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

1.6.3.1. *Príprava*

Prístroje

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

Pohyblivá fáza

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

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

▼B

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

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

Rozpustené látky

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

Podmienky skúšania

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

1.6.3.2. ***Meranie***

Výpočet nečinnej doby t_0

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

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

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

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

▼B

Kalibračný graf

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

Stanovenie kapacitného faktora testovanej látky

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

2. **ÚDAJE**

Metóda trepačkovej banky

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

3. **SPRÁVA**

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

— presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímesi),

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

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

V prípade metódy trepačkovej banky:

— výsledok predbežného odhadu, ak sa takýto uskutočnil,

— teplotu, pri ktorej sa hodnoty stanovovali,

— údaje o analytických postupoch uplatnených pri stanovovaní koncentrácií,

— čas a rýchlosť odstreďovania, ak sa použilo,

▼B

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

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

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

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

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

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

— hodnotu pH použitej vody a vodnej fázy počas pokusu,

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

V prípade metódy HPLC (vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie):

— výsledok predbežného odhadu, ak sa takýto uskutočnil,

— testované a referenčné látky a ich čistotu,

— teplotné rozmedzie jednotlivých stanovení,

— hodnoty pH, pri ktorých sa stanovenia vykonali,

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

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

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

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

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

— eluačné profily,

— množstvá testovaných a referenčných látok zavedených do kolóny,

— nečinnú dobu a spôsob, akým sa merala.

▼B

4. **ODKAZY**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼B

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

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

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

▼B

Dodatok 1

Výpočtové/odhadové metódy

ÚVOD

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

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

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

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

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

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

ODHADOVÁ METÓDA

Predbežný odhad rozdeľovacieho koeficientu

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

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

VÝPOČTOVÉ METÓDY

Princíp výpočtových metód

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

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

Kritériá kvality

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

▼B

Postupy výpočtov

Hanschova π-metóda

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

π_x = log P_{ow} (PhX) - log P_{ow} (PhH)

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

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

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

Rekkerova metóda

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

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

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

Hanschova-Leova metóda

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

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

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

Kombinovaná metóda

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

Poznámky

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

▼B

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

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

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

Správa

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

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

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

— opis použitej výpočtovej metódy,

— identifikáciu alebo spôsob zásobovania databázy,

— zvláštnosti vo výbere (voľbe) fragmentov,

— kompletnú dokumentáciu výpočtov.

ODKAZY

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

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

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

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

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

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

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

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

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

▼B

Dodatok 2

Odporúčané referenčné látky pre metódu HPLC

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

▼B

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

▼B

A.9. TEPLOTA VZPLANUTIA

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

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

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

1.2. POJMY A JEDNOTKY

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

Jednotky: ^{o}C

$t = T - 273,15$

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

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

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

1.4. PRINCÍP METÓDY

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

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

1.5.1. **Opakovateľnosť**

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

1.5.2. **Citlivosť**

Citlivosť závisí od použitej skúšobnej metódy.

1.5.3. **Špecifickosť**

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

▼B

1.6. OPIS METÓDY

1.6.1. **Príprava**

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

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

1.6.2. **Podmienky skúšania**

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

1.6.3. **Realizácia testu**

1.6.3.1. *Rovnovážna metóda*

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

1.6.3.2. *Nerovnovážna metóda*

Abelov prístroj:

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

Abelov-Penskyho prístroj:

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

Tagov prístroj:

Pozri technickú normu ASTM D 56.

Penskyho-Martensov prístroj:

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

Poznámky:

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

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

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

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

▼B

2. **ÚDAJE**

3. **SPRÁVA**

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

— presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímesi),

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

— výsledky a všetky doplnkové poznámky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

4. **ODKAZY**

Žiadne.

▼B

A.10. HORĽAVOSŤ (TUHÉ LÁTKY)

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

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

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

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

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

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Čas horenia je vyjadrený v sekundách.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Nie sú špecifikované.

1.4. PRINCÍP METÓDY

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

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Nie sú stanovené.

▼B

1.6. OPIS METÓDY

1.6.1. **Predbežný skríningový test**

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

1.6.2. **Test rýchlosti horenia**

1.6.2.1. *Príprava*

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

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

1.6.2.2. *Podmienky skúšania*

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

1.6.2.3. *Realizácia testu*

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

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

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

▼B

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

2. **ÚDAJE**

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

3. **SPRÁVA**

3.1. SPRÁVA Z TESTU

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

— presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímesi),

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

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

— všetky doplňujúce poznámky a pripomienky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

3.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

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

4. **ODKAZY**

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

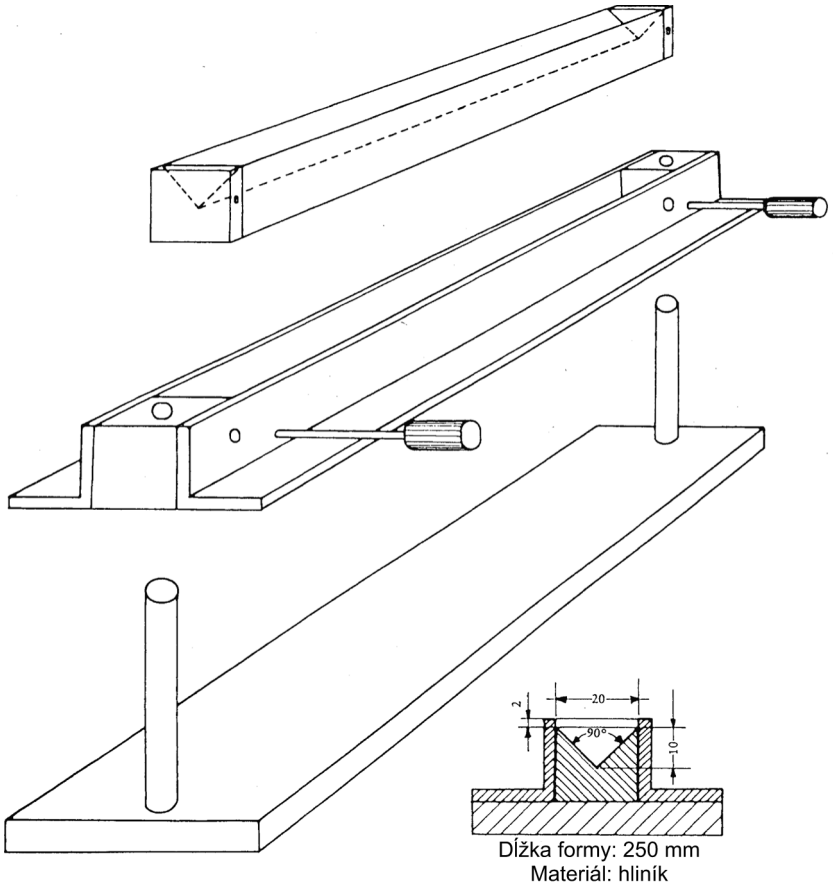
▼B

Dodatok

Obrázok

Forma a príslušenstvo na prípravu hranice z práškovitej testovanej látky

(všetky rozmery sa uvádzajú v milimetroch)



Dĺžka formy: 250 mm
Materiál: hliník

▼B

A.11. HORĽAVOSŤ (PLYNY)

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

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

1.2. POJMY A JEDNOTKY

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

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Nie sú špecifikované.

1.4. PRINCÍP METÓDY

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

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Nie sú stanovené.

1.6. OPIS METÓDY

1.6.1. **Prístroje**

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

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

1.6.2. **Podmienky skúšania**

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

▼B

1.6.3. **Realizácia testu**

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

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

2. **ÚDAJE**

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

3. **SPRÁVA**

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

— presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímesi),

— opis použitého prístroja s uvedenými rozmermi,

— teplotu, pri ktorej sa test uskutočnil,

— testované koncentrácie a získané výsledky,

— výsledok testu: nehorľavý alebo mimoriadne horľavý plyn,

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

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

4. **ODKAZY**

(1) NF T 20-041 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases.

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

▼B

A.12. HORĽAVOSŤ (KONTAKT S VODOU)

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

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

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

1.2. POJMY A JEDNOTKY

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

1.3. PRINCÍP METÓDY

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

1.3.1. **Krok 1**

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

1.3.2. **Krok 2**

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

1.3.3. **Krok 3**

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

1.3.4. **Krok 4**

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

▼B

1.4. REFERENČNÉ LÁTKY

Nie sú špecifikované.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Nie sú stanovené.

1.6. OPIS METÓD

1.6.1. **Krok 1**

1.6.1.1. *Podmienky skúšania*

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

1.6.1.2. *Realizácia testu*

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

1.6.2. **Krok 2**

1.6.2.1. *Prístroje*

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

1.6.2.2. *Podmienky skúšania*

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

1.6.2.3. *Realizácia testu*

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

1.6.3. **Krok 3**

1.6.3.1. *Podmienky skúšania*

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

1.6.3.2. *Realizácia testu*

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

▼B

1.6.4. **Krok 4**

1.6.4.1. *Prístroje*

Prístroj je zostavený podľa nákresu na obrázku.

1.6.4.2. *Podmienky skúšania*

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

1.6.4.3. *Realizácia testu*

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

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

2. **ÚDAJE**

Testovaná látka sa považuje za nebezpečnú, ak:

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

alebo

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

3. **SPRÁVA**

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

— presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímesi),

— podrobnosti o akejkoľvek počiatočnej príprave testovanej látky,

▼B

— výsledky testu (kroky 1, 2, 3 a 4),

— identifikáciu uvoľneného plynu,

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

— všetky doplnkové poznámky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

4. **ODKAZY**

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

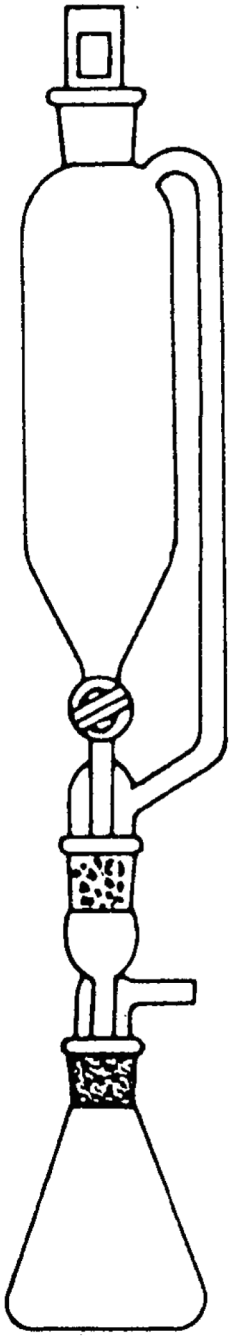
(2) NF T 20-040 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼B

Dodatok

Obrázok

Prístroj



▼B

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

1. **METÓDA**

1.1. ÚVOD

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

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

1.2. POJMY A JEDNOTKY

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

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

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Nie sú špecifikované.

1.4. PRINCÍP METÓDY

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

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

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

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY

1.6.1. **Prístroje**

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

Poznámka:

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

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

▼B

1.6.2. **Realizácia testu**

a) *Práškové tuhé látky*

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

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

b) *Kvapaliny*

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

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

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

2. **ÚDAJE**

2.1. PRÁCA S VÝSLEDKAMI

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

2.2. VYHODNOTENIE

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

3. **SPRÁVA**

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

— presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímesi),

— výsledky testov,

— všetky doplnkové poznámky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

4. **ODKAZY**

(1) NF T 20-039 (SEPT 85). Chemical products for industrial use. Determination of the spontaneous flammability of solids and liquids.

(2) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Test and criteria, 1990, United Nations, New York.

▼B

A.14. VÝBUŠNÉ VLASTNOSTI

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

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

Metóda pozostáva z troch častí:

a) testu citlivosti na teplo (1);

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

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

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

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

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

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Výbušné látky:

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

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

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

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

▼B

1.4. PRINCÍP METÓDY

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

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

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

1.4.2. **Citlivosť na teplo**

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

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

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

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

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

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Nie sú stanovené.

1.6. OPIS METÓDY

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

1.6.1.1. *Prístroje*

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

▼B

1.6.1.2. *Podmienky skúšania*

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

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

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

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

1.6.1.3. *Realizácia testov*

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

▼B

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

1.6.1.4. *Vyhodnotenie*

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

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

1.6.2.1. *Prístroje (obrázok 4)*

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

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

1.6.2.2. *Podmienky skúšania*

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

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

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

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

▼B

1.6.2.3. *Realizácia testov*

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

1.6.2.4. *Vyhodnotenie*

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

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

1.6.3.1. *Prístroje (obrázok 5)*

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

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

1.6.3.2. *Podmienky skúšania*

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

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

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

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

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

▼B

1.6.3.3. *Realizácia testov*

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

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

1.6.3.4. *Vyhodnotenie*

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

2. **ÚDAJE**

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

3. **SPRÁVA**

3.1. SPRÁVA Z TESTU

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

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

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

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

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

— výsledky z každého typu testu,

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

▼B

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

— všetky doplnkové poznámky a pripomienky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

3.2. INTERPRETÁCIA A VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV

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

4. **ODKAZY**

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

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

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

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

▼B

Dodatok

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

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

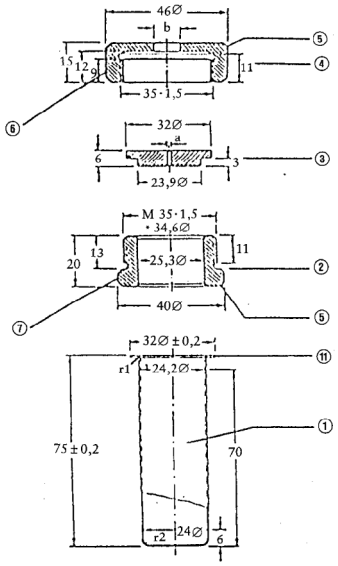
(2) Uzáverová doštička s otvorom: materiálová špecifikácia č. 1.4873.

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

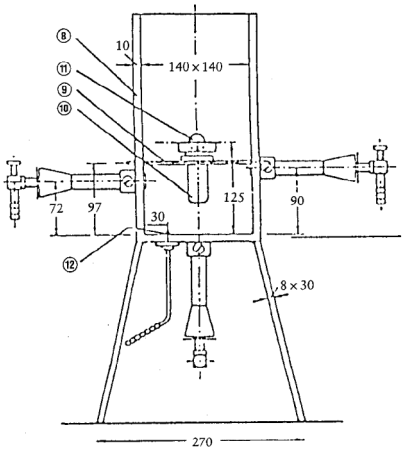
Obrázok 1

Testovací prístroj na stanovenie citlivosti na teplo

(všetky rozmery sú uvedené v milimetroch)



Obr. 1a Oceľová rúra a príslušenstvo



Obr. 1b Zohrievacie a ochranné zariadenie

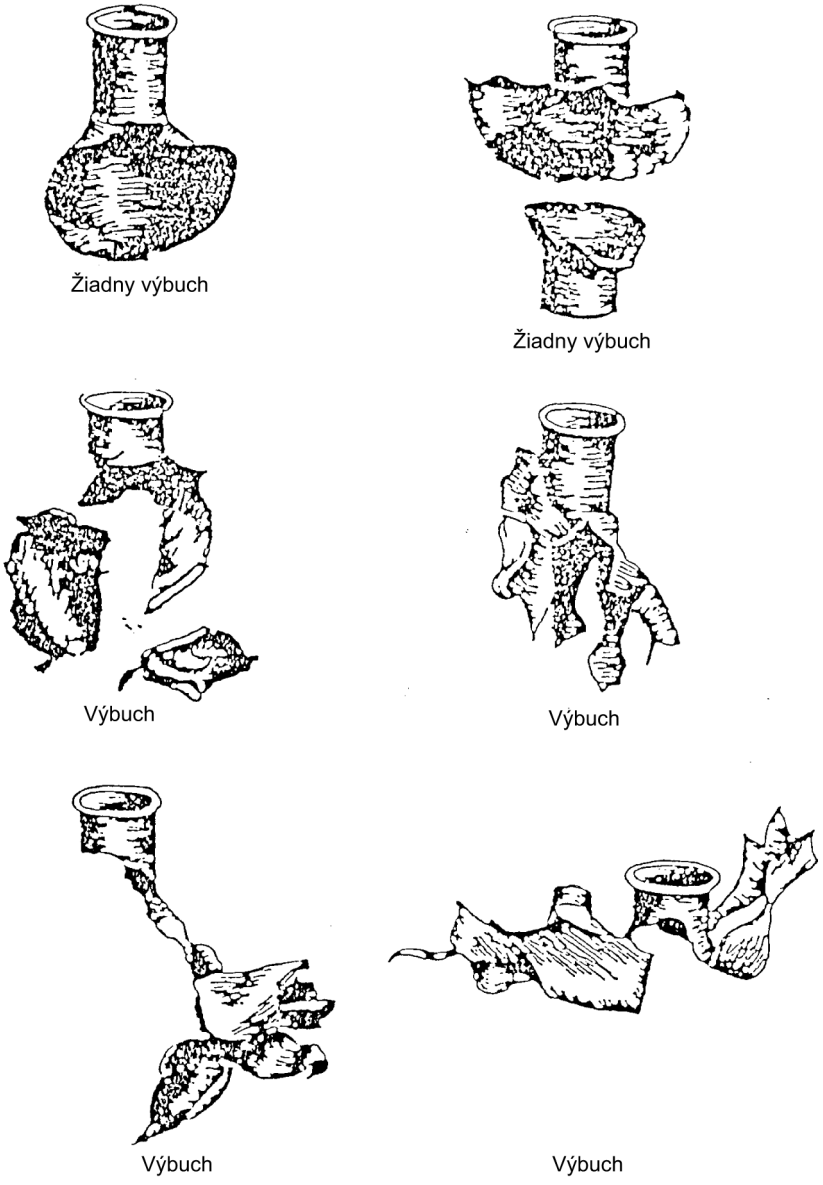
1. rúra
1. a) vonkajšia príruba
2. závitový golier; závit s nízkym trením
3. úzáverová doštička s otvorom s priemerom a = 2,0 alebo 6,0 mm
4. matica s otvorom s priemerom b = 10 mm
5. skosený povrch
6. 2 rovné plôšky pre kľúč na matice veľkosti 41
7. 2 rovné plôšky pre kľúč na matice veľkosti 36
8. ochranné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

▼B

Obrázok 2

Test citlivosti na teplo

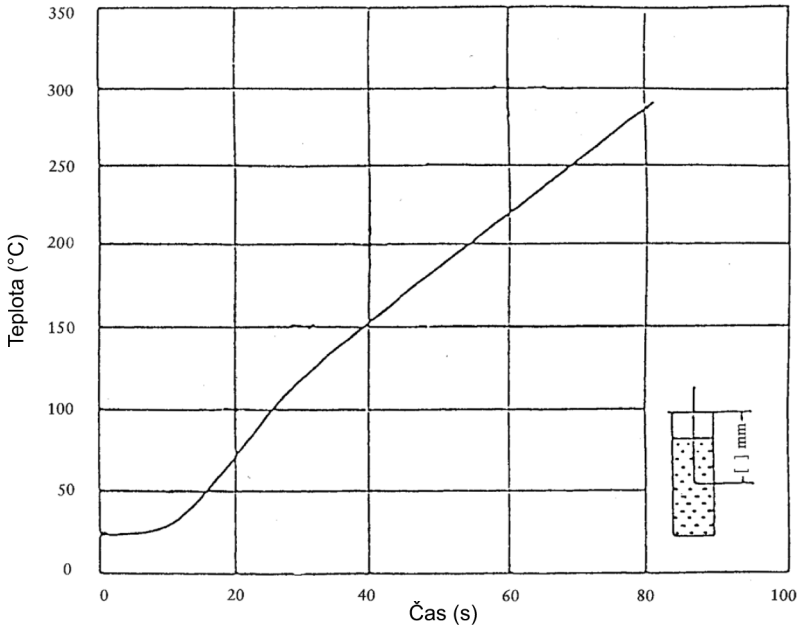
(príklady trieštenia)



▼B

Obrázok 3

Kalibrácia rýchlosti ohrevu pre test citlivosti na teplo



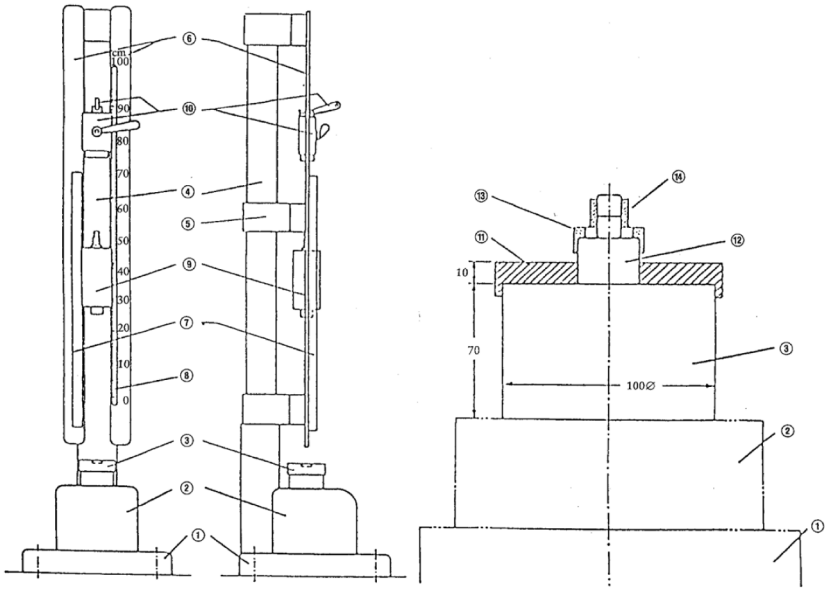
Krivka teploty a času dosiahnutá zohrievaním dibutylftalátu (27 cm^5) v uzavretej rúre (uzáverová doštička s otvorom 1,5 mm) pri nastavení prietoku propánu na 3,2 l/min. Teplota sa meria Cr-Al termočlánkom s priemerom 1 mm uloženým v ochrannom plášti z nehrdzavejúcej ocele, umiestneným centrálne 43 mm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

▼B

Obrázok 4

Prístroj na testovanie citlivosti látok na náraz

(všetky rozmery sú uvedené v milimetroch)



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

1. Základňa 450 × 450 × 60
2. Oceľový blok 230 x 250 x 200
3. Nákova, Ø 100 x 70
4. Stojan
5. Stredná priečka
6. Dve vodiace lišty
7. Ozubená tyč

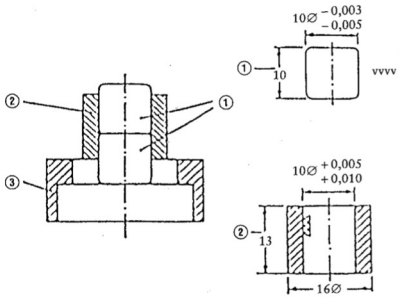
Obr. č. 4b Padací buchar, spodná časť (detail)

8. Delená stupnica
9. Padací buchar
10. Upínacie spúšťacie zariadenie
11. Umiestňovacia platňa
12. Vložená nákova (vymeniteľná), ø 26 × 26
13. Umiestňovací krúžok s otvormi
14. Nárazový mechanizmus

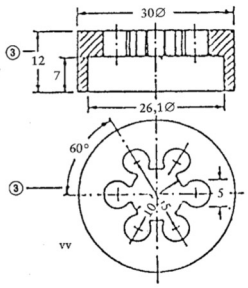
▼B

Obrázok 4

Pokračovanie

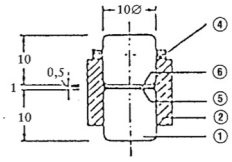


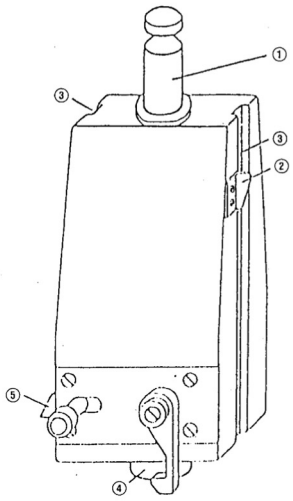
Obr. 4 c Nárazový mechanizmus pre chemické látky v práškovej alebo pastovitej forme



Obr. 4 d Nárazový mechanizmus pre kvapalné látky

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





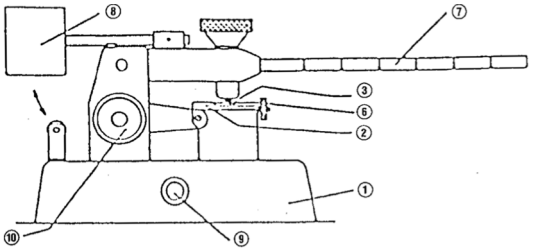
Obr. 4 e Buchar (padacie závažie hmotnosti 5 kg)

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

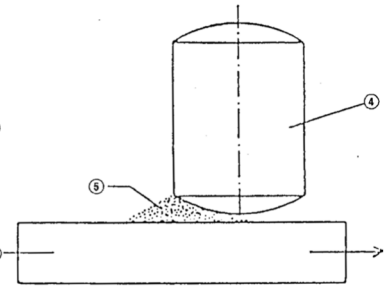
▼B

Obrázok 5

Prístroj na testovanie citlivosti látok na trenie



Obr. 5a Nárys a pôdorys



Obr. 5b Východisková poloha kolíka na vzorke

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

▼B

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

1. **METÓDA**

1.1. ÚVOD

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

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

1.2. POJMY A JEDNOTKY

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

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

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

1.4. PRINCÍP METÓDY

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

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

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

Citlivosť a špecifickosť závisia od použitej skúšobnej metódy.

1.6. OPIS METÓDY

1.6.1. **Prístroje**

Prístroj je opísaný v metóde uvedenej v 1.6.3.

1.6.2. **Podmienky skúšania**

Vzorka testovanej látky sa testuje podľa metódy uvedenej v 1.6.3.

1.6.3. **Realizácia testu**

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

▼B

2. **ÚDAJE**

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

3. **SPRÁVA**

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

— presnú špecifikáciu testovanej látky (identifikáciu a prímesi),

— množstvo použitej vzorky, atmosférický tlak,

— použitý prístroj,

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

— všetky doplnkové poznámky a pripomienky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

4. **ODKAZY**

Žiadne.

▼B

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

1. **METÓDA**

1.1. ÚVOD

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

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

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

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

1.2. POJMY A JEDNOTKY

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

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP METÓDY

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

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS METÓDY

1.6.1. **Prístroje**

1.6.1.1. *Piecka*

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

▼B

1.6.1.2. *Kocka z drôtenej siete*

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

1.6.1.3. *Tepelné články (termočlánky)*

Vhodné tepelné články (termočlánky).

1.6.1.4. *Registračný prístroj*

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

1.6.2. **Podmienky skúšania**

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

1.6.3. **Realizácia testu**

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

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

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

2. **ÚDAJE**

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

3. **SPRÁVA**

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

— opis testovanej látky,

— výsledky merania vrátane krivky teploty/času,

— všetky doplnkové poznámky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

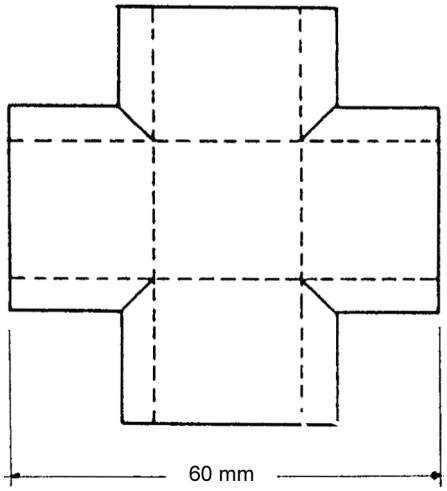
4. **ODKAZY**

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

▼B

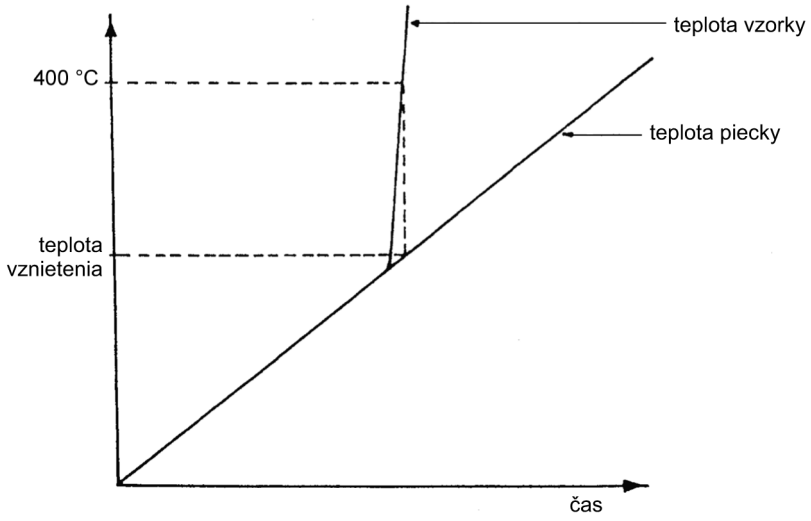
Obrázok 1

Schéma 20 mm testovanej kocky



Obrázok 2

Typická krivka teploty/času



▼B

A.17. OXIDAČNÉ VLASTNOSTI (TUHÉ LÁTKY)

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

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

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

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

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

1.2. POJEM A JEDNOTKY

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

Rýchlosť horenia: vyjadrená v milimetroch za sekundu.

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

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

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

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

1.4. PRINCÍP METÓDY

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

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

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

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

▼B

1.6. OPIS METÓDY

1.6.1. **Príprava**

1.6.1.1. *Testovaná látka*

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

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

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

1.6.1.2. *Horľavina*

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

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

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

1.6.1.3. *Zápalný zdroj*

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

1.6.2. **Realizácia testu**

Poznámka:

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

1.6.2.1. *Predbežný test*

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

▼B

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

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

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

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

1.6.2.2. *Hlavný test*

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

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

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

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

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

Dotykom plameňa sa zapáli jeden koniec hranice z práškovej zmesi.

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

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

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

▼B

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

2. **ÚDAJE**

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

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

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

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

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

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

3. **SPRÁVA**

3.1. SPRÁVA Z TESTU

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

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

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

— druh zápalného zdroja použitého v teste,

— výsledky meraní,

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

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

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

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

▼B

3.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Látku treba považovať za oxidačnú vtedy, keď:

a) v predbežnom skríningovom teste došlo k prudkej reakcii;

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

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

4. **ODKAZY**

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

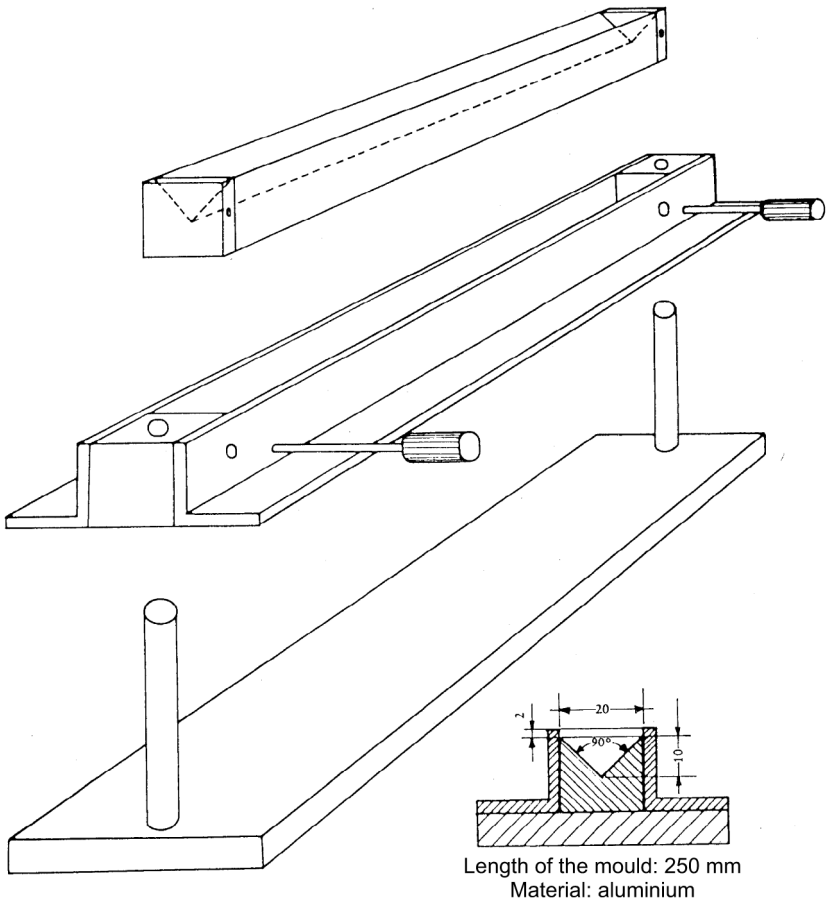
▼B

Dodatok

Obrázok

Forma a príslušenstvo na prípravu hranice z práškovitej skúšobnej látky

(všetky rozmery sú uvedené v milimetroch)



▼B

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

1. METÓDA

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

1.1. ÚVOD

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

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

1.2. DEFINÍCIE A JEDNOTKY

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

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

kde:

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

M_i je molekulová hmotnosť polymérovej frakcie pri retenčnom objeme V_i a

n je počet dátových bodov.

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

▼B

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

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

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

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

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

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

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

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

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

▼B

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

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

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p je molekulová hmotnosť štandardu v maxime píku)

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. **Príprava štandardných roztokov polystyrénu**

Polystyrénové štandardy sa opatrným miešaním rozpustia vo zvolenom elučnom činidle. Pri príprave roztokov sa treba riadiť odporúčaniami výrobcov.

Voľba koncentrácií štandardov závisí od rozličných faktorov, napríklad od nanášacieho objemu, viskozity roztoku a citlivosti analytického detektora. Maximálny nanášací objem musí byť prispôsobený dĺžke kolóny, aby nedochádzalo k jej preťaženiu. Zvyčajné nanášacie objemy pri analytických separáciách pomocou GPC sa pri kolóne s rozmermi 30 cm × 7,8 mm pohybujú v rozmedzí 40 až 100 µl. Je možné použiť aj vyššie objemy, nemali by však presiahnuť 250 µl. Pred samotnou kalibráciou kolóny je potrebné určiť optimálny pomer medzi nanášacím objemom a koncentráciou nanášanej vzorky.

1.6.2. **Príprava roztoku vzorky**

V zásade rovnaké požiadavky sa vzťahujú aj na prípravu roztokov vzoriek. Vzorka sa opatrným potriasaním rozpustí vo vhodnom rozpúšťadle, napríklad v tetrahydrofuráne (THF). V žiadnom prípade ju nemožno rozpúšťať v ultrazvukovom kúpeli. V prípade potreby sa vzorka prečistí filtráciou cez membránový filter s veľkosťou pórov medzi 0,2 µm a 2 µm.

V záverečnej správe sa treba zmieniť o prítomnosti nerozpustených tuhých častíc, ktoré môžu byť dôsledkom prítomnosti vysokých molekulových hmotností. Percentuálne zastúpenie hmotnosti rozpustených čiastočiek je potrebné určiť pomocou primeranej metódy. Roztoky sa musia použiť do 24 hodín.

1.6.3. **Prístrojové vybavenie**

— nádrž na rozpúšťadlo,

— zariadenie na odplynenie kvapalín (ak je potrebné),

— čerpadlo,

▼B

— tlmič pulzov kvapaliny (ak je potrebný),

— nanášací systém,

— chromatografické kolóny,

— detektor,

— prietokomer (ak je potrebný),

— zariadenie na zaznamenávanie a spracúvanie údajov,

— nádoba na odpad.

Treba zabezpečiť inertnosť systému GPC voči používaným rozpúšťadlám (napríklad použitím oceľových kapilár, ak je rozpúšťadlo THF).

1.6.4. **Nanášací systém a systém na privádzanie rozpúšťadla**

Buď pomocou automatického nanášacieho zariadenia, alebo ručne sa na kolónu nanesie v ostro vymedzenej zóne presne definované množstvo roztoku vzorky. Príliš rýchle vytiahnutie striekačky alebo stlačenie jej piestu pri ručnom nanášaní vzorky môže spôsobiť zmeny v pozorovanej distribúcii molekulových hmotností. Systém na privádzanie rozpúšťadla by nemal spôsobovať pulzové vlny, čo možno v ideálnom prípad zabezpečiť zaradením tlmiča pulzov. Prietok sa pohybuje okolo hodnoty 1 ml/min.

1.6.5. **Kolóna**

V závislosti od vzorky možno polymér charakterizovať buď pomocou jedinej kolóny, alebo pomocou viacerých za sebou spojených kolón. Ako náplň kolóny je komerčne dostupných viacero poréznych materiálov s definovanými vlastnosťami (napríklad veľkosť pórov, limit vylučovania). Voľba separačného gélu a dĺžky kolóny závisí od vlastností vzorky (hydrodynamické objemy, distribúcia molekulových hmotností) aj od špecifických podmienok pri separácii, napríklad od typu rozpúšťadla, teploty a rýchlosti prietoku (1) (2) (3).

1.6.6. **Teoretické poschodia kolóny**

Kolóna alebo kombinácia viacerých kolón používaných pri separácii musí byť charakterizovaná počtom teoretických poschodí. V prípade THF ako rozpúšťadla sa to robí tak, že na kolónu so známou dĺžkou sa nanesie roztok etylbenzénu alebo iného vhodného nepolárneho rozpúšťadla. Počet teoretických poschodí udáva táto rovnica:

$$N = 5,54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \qquad \text{alebo} \qquad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

kde:

N = počet teoretických poschodí

V_e = elučný objem v maxime píku

▼B

W = šírka píku pri základnej čiare

$W_{1/2}$ = šírka píku v polovici jeho výšky

1.6.7. **Účinnosť separácie**

Okrem počtu teoretických poschodí, ktorý určuje šírku pásu, hrá pri separácii úlohu aj jej účinnosť, ktorá sa určuje na základe strmosti kalibračnej krivky. Účinnosť separácie kolóny možno získať z tohto vzťahu:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{veľkosť plochy prierezu kolúny}} \geq 6,0 \left[\frac{cm^3}{cm^2}\right]$$

kde:

$V_{e,\,Mx}$ = elučný objem polystyrénu s molekulovou hmotnosťou M_x

$V_{e,(10.Mx)}$ = elučný objem polystyrénu s desaťnásobne väčšou molekulovou hmotnosťou.

Rozlíšiteľnosť systému sa zvyčajne definuje takto:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

kde:

V_{e1}, V_{e2} = elučné objemy dvoch polystyrénových štandardov v maxime píku

W_1, W_2 = šírky píkov pri základnej čiare

M_1, M_2 = molekulové hmotnosti v maxime píku (mali by sa líšiť o faktor 10)

R-hodnota kolóny musí byť vyššia ako 1.7 (4).

1.6.8. **Rozpúšťadlá**

Všetky rozpúšťadlá musia mať vysoký stupeň čistoty (pri THF je stupeň čistoty 99,5 %). Zásobník na rozpúšťadlo (v prípade potreby s atmosférou inertného plynu) musí byť dostatočne veľký, aby umožnil kalibráciu kolóny a analýzu niekoľkých vzoriek. Pred vháňaním do kolóny pomocou čerpadla treba rozpúšťadlo zbaviť plynov.

1.6.9. **Kontrola teploty**

Teplota kritických vnútorných zložiek systému (nanášacia slučka, detektor a hadičky) musí byť stála a musí zodpovedať zvolenému rozpúšťadlu.

▼B

1.6.10. **Detektor**

Účelom detektora je kvantitatívne zaznamenávanie koncentrácie vzorky, ktorá sa eluuje z kolóny. V záujme eliminácie zbytočného rozširovania píku by mala mať kyveta meracej komôrky detektora čo možno najmenší objem. S výnimkou detektorov založených na rozptyle svetla a viskozitných detektorov by nemal tento objem presahovať 10 µl. Ako detekčná metóda sa zvyčajne používa diferenciálna refraktometria. V závislosti od osobitných požiadaviek vzorky alebo elučného činidla však možno použiť aj iné typy detektorov, napríklad UV/VIS, IR, viskozitný detektor atď.

2. ÚDAJE A PRÍPRAVA TESTOVACEJ SPRÁVY

2.1. ÚDAJE

Podrobné vyhodnocovacie kritériá a požiadavky vzťahujúce sa na zber a spracúvanie údajov sú uvedené v norme DIN (1).

Pri každej vzorke je potrebné uskutočniť dva nezávislé pokusy. Každý z nich treba analyzovať osobitne.

Pri každom meraní treba udať M_n, M_w, M_w/M_n a M_p. Treba výslovne uviesť, že namerané hodnoty sú pomerné hodnoty ekvivalentné použitým štandardom.

Po stanovení retenčných objemov alebo retenčných časov (podľa možnosti korigovaných použitím vnútorného štandardu) sa voči jednej z týchto hodnôt nanášajú do grafu hodnoty log M_p (M_p je maximum píku kalibračného štandardu). Na každú dekádu molekulových hmotností treba použiť aspoň dva kalibračné body, na zostrojenie celej kalibračnej krivky, ktorá by mala pokrývať odhadnutú molekulovú hmotnosť vzorky, je potrebných aspoň päť bodov. Koncový bod kalibračnej krivky v oblasti nízkych molekulových hmotností sa definuje pomocou n-hexylbenzénu alebo iného vhodného nepolárneho rozpúšťadla. Číselné priemerné a hmotnostné priemerné molekulové hmotnosti sa vo všeobecnosti stanovujú pomocou elektronického spracúvania údajov, založeného na vzorcoch uvedených v časti 1.2. V prípade manuálnej digitalizácie sa možno riadiť dokumentom ASTM D 3536-91 (3).

V prípade zadržania každého nerozpustného polyméru v kolóne je vysoko pravdepodobné, že jeho molekulová hmotnosť je vyššia ako molekulová hmotnosť rozpustnej frakcie. Výsledkom nevzatia tejto skutočnosti do úvahy môže byť nadhodnotenie zastúpenia zložiek s nízkou molekulovou hmotnosťou. Návod na uskutočnenie korekcie obsahu zložiek s nízkou molekulovou hmotnosťou na nerozpustný polymér je uvedený v dodatku.

2.2. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí obsahovať tieto informácie:

2.2.1. **Testovaná látka:**

— dostupné informácie o testovanej látke (totožnosť, prísady, nečistoty/prímesi),

▼B

— postup spracovania vzorky, zistené skutočnosti, problémy.

2.2.2. **Prístroje a zariadenia:**

— zásobník na elučné činidlo, inertný plyn, zariadenie na odplynenie elučného činidla,

— zloženie elučného činidla, nečistoty/prímesi,

— čerpadlo, tlmič pulzov kvapaliny, nanášací systém, rozdeľovacie kolóny (výrobca, všetky informácie o charakteristikách kolón, ako sú veľkosť pórov, druh separačného materiálu atď., počet, dĺžka a usporiadanie použitých kolón),

— počet teoretických poschodí kolóny (alebo kombinácie kolón), účinnosť rozdeľovania (rozlišovacia schopnosť systému),

— informácie o symetrii píkov,

— teploty kolóny, spôsob kontroly teploty,

— detektor (princíp merania, typ, objem meracej kyvety),

— prietokomer, ak sa používa (výrobca, princíp merania),

— systém na zaznamenávanie a spracúvanie údajov (hardvér a softvér).

2.2.3. **Kalibrácia systému:**

— podrobný opis metódy použitej na zostrojenie kalibračnej krivky,

— informácie o kritériách kvality tejto metódy (napríklad korelačný koeficient, odchýlka súčtu štvorcov atď.),

— informácie o všetkých extrapoláciách, predpokladoch a aproximáciách, ktoré sa uskutočnili počas priebehu pokusu, a o vyhodnocovaní a spracúvaní údajov,

— všetky merania, ktoré boli použité na zostrojenie kalibračnej krivky musia byť zdokumentované v tabuľke, ktorá obsahuje pre každý bod merania tieto informácie:

  — názov vzorky,

  — výrobcu vzorky,

  — charakteristické hodnoty štandardov, t. j. M_p, M_n, M_w a M_w/-M_n, tak ako ich uvádza výrobca alebo ako boli odvodené z následných meraní, a tiež podrobnosti o metóde stanovenia,

  — nanášací objem a koncentráciu nanesenej vzorky,

▼B

— hodnotu M_p, ktorá bola použitá na kalibráciu,

— elučný objem alebo opravený retenčný čas, nameraný pri maxime píku,

— M_p vypočítaná v maxime píku,

— percentuálna odchýlka vypočítanej hodnoty M_p od kalibračnej krivky.

2.2.4. **Vyhodnotenie:**

— vyhodnotenie na základe času: metódy použité na zabezpečenie požadovanej reprodukovateľnosti (korekčná metóda, vnútorné štandardy atď.),

— informácia o tom, či bolo vyhodnotenie vykonané na základe elučného objemu alebo retenčného času,

— informácie o limitoch vyhodnocovania, ak nebola vykonaná úplná analýza píku,

— opis vyrovnávacej/prekladacej metódy, ak sa pri grafickom vyhodnocovaní použila,

— príprava a predbežné spracovanie vzorky,

— prítomnosť nerozpustených čiastočiek, ak boli pozorované,

— objem (µl) a koncentrácia (mg/ml) nanesenej vzorky,

— opis vplyvov, ktoré mohli spôsobiť odchýlku od ideálneho GPC profilu,

— podrobný opis modifikácií uskutočnených v testovacej metóde,

— podrobnosti o rozsahu chýb merania,

— všetky iné informácie a pozorované skutočnosti, ktoré by mohli byť významné z hľadiska interpretácie výsledkov.

3. **ODKAZY**

(1) DIN 55672 (1995). Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil I.

(2) Yau, W. W., Kirkland, J. J., and Bly, D. D. eds. (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography; J. Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test Method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High-Performance Size- Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Dodatok

Príklad ďalších metód na stanovenie číselnej priemernej molekulovej hmotnosti (M_n) polymérov

Prednostnou metódou na stanovenie M_n je gélová permeačná chromatografia (GPC), najmä ak je k dispozícii séria štandardov so štruktúrou podobnou štruktúre stanovovaného polyméru. V prípadoch, v ktorých je použitie GPC sprevádzané praktickými problémami, alebo ak je vopred známe, že polymér nespĺňa regulačné kritérium pre M_n, sú k dispozícii náhradné metódy ako napríklad:

1. **Využitie koligatívnych vlastností**

1.1. Ebulioskopia/kryoskopia:

meria sa zvyšovanie bodu varu (ebulioskopia) alebo znižovanie bodu tuhnutia (kryoskopia) rozpúšťadla, do ktorého sa pridáva polymér. Metóda je založená na skutočnosti, že vplyv rozpusteného polyméru na bod varu/tuhnutia kvapaliny závisí od jeho molekulovej hmotnosti (1) (2).

Použiteľnosť: $M_n < 20\,000$.

1.2. Znižovanie tlaku pár:

pri tejto metóde sa meria tlak pár zvolenej referenčnej kvapaliny pred a po pridaní známych množstiev polyméru (1) (2).

Použiteľnosť: $M_n < 20\,000$ (teoreticky; v praxi je užitočnosť metódy obmedzená).

1.3. Membránová osmometria:

metóda využíva princíp osmózy, t. j. prirodzený sklon molekúl rozpúšťadla prechádzať cez polopriepustnú membránu zo zriedeného do koncentrovaného prostredia až po dosiahnutie rovnováhy. Pri pokuse má zriedený roztok nulovú koncentráciu a koncentrovaný roztok obsahuje polymér. Prechádzaním rozpúšťadla vzniká rozdiel tlaku, ktorého veľkosť závisí od koncentrácie a molekulovej hmotnosti polyméru (1) (3) (4).

Použiteľnosť: M_n medzi 20 000 – 200 000.

1.4. Osmometria v plynnej fáze:

pri tejto metóde sa porovnáva rýchlosť odparovania čistého aerosólu rozpúšťadla s rýchlosťou odparovania najmenej troch aerosólov obsahujúcich rozličné koncentrácie polyméru (1) (5) (6).

Použiteľnosť: $M_n < 20\,000$.

▼B

2. **Analýza koncovej skupiny**

Na použitie tejto metódy je potrebné poznať celkovú štruktúru polyméru a aj povahu skupín nachádzajúcich sa na konci reťazcov (tieto skupiny musia byť od hlavného reťazca polyméru odlíšiteľné napríklad pomocou NMR alebo titrácie/derivatizácie). Zo stanovenia molekulárnej koncentrácie koncových skupín, ktoré sa nachádzajú v polyméri, možno vypočítať hodnotu molekulovej hmotnosti (7) (8) (9).

Použiteľnosť: M_n do 50 000 (s klesajúcou spoľahlivosťou).

3. **Odkazy**

(1) Billmeyer, F.W. Jr., (1984). Textbook of Polymer Science, 3rd Edn., John Wiley, New York.

(2) Glover, C.A., (1975). Absolute Colligative Property Methods. Chapter 4. In: Polymer Molecular Weights, Part I P.E. Slade, Jr. ed., Marcel Dekker, New York.

(3) ASTM D 3750-79, (1979). Standard Practice for Determination of Number-Average Molecular Weight of Polymers by Membrane Osmometry. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) Coll, H. (1989). Membrane Osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., J. Wiley and Sons, 25 – 52.

(5) ASTM 3592-77, (1977). Standard Recommended Practice for Determination of Molecular Weight by Vapour Pressure, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(6) Morris, C.E.M., (1989). Vapour Pressure osmometry. In: Determination of Molecular Weight, A.R. Cooper ed., John Wiley and Sons.

(7) Schröder, E., Müller, G., and Arndt, K-F., (1989). Polymer Characterisation, Carl Hanser Verlag, Munich.

(8) Garmon, R.G., (1975). End-Group Determinations, Chapter 3 In: Polymer Molecular Weights, Part I, P.E. Slade, Jr. ed. Marcel Dekker, New York.

(9) Amiya, S., et al. (1990). Pure and Applied Chemistry, 62, 2139 – 2146.

▼B

A.19. OBSAH ZLOŽIEK S NÍZKOU MOLEKULOVOU HMOTNOSŤOU V POLYMÉROCH

1. METÓDA

Táto metóda, založená na gélovej permeačnej chromatografii, je prevzatá z OECD TG 119 (1996). Základné princípy a ďalšie technické informácie sú uvedené v literárnych odkazoch.

1.1. ÚVOD

Vlastnosti polymérov sú veľmi rôznorodé, a nie je preto možné opísať jedinú metódu, ktorá by presne vymedzovala podmienky ich separácie a vyhodnocovania a ktorá by brala do úvahy všetky možnosti a špecifické situácie vyskytujúce sa pri separácii polymérov. Predovšetkým nie vždy možno pri komplexných polymérových systémoch použiť gélovú permeačnú chromatografiu (GPC). Tam, kde nie je použitie GPC z praktického hľadiska možné, dajú sa molekulové hmotnosti stanoviť inými spôsobmi (pozri dodatok). V takýchto prípadoch je potrebné uviesť všetky podrobnosti a použitie konkrétnej metódy treba odôvodniť.

Opisovaná metóda je založená na norme DIN 55672 (1). Podrobné informácie o vykonaní pokusu a spôsobe vyhodnotenia údajov možno nájsť v uvedenej norme. Všetky zmeny, ktoré treba v metóde urobiť, musia byť odôvodnené. Možno použiť aj iné normy, no treba pri tom uviesť plný literárny odkaz. Pri opisovanej metóde sa na kalibráciu používajú vzorky polystyrénu so známou polydisperzitou a možno ju modifikovať tak, aby bola vhodná pre určité polyméry, napríklad pre polyméry rozpustné vo vode a vetvené polyméry s dlhými reťazcami.

1.2. DEFINÍCIE A JEDNOTKY

Nízka molekulová hmotnosť je arbitrárne definovaná ako molekulová hmotnosť nižšia ako 1 000 daltonov.

Číselná priemerná molekulová hmotnosť M_n a hmotnostná priemerná molekulová hmotnosť M_w sa stanovili pomocou týchto rovníc:

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i/M_i} \qquad M_w = \frac{\sum_{i=1}^{n} H_i \times M_i}{\sum_{i=1}^{n} H_i}$$

kde:

H_i = hladina signálu detektora od základnej čiary retenčného objemu V_i,

M_i = molekulová hmotnosť polymérovej frakcie pri retenčnom objeme V_i a n je počet dátových bodov

Šírka distribúcie molekulových hmotností, ktorá predstavuje mieru disperzity systému, je daná pomerom M_w/M_n.

▼B

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

GPC je relatívna metóda, a preto je potrebné uskutočniť kalibráciu. Bežne sa na tento účel používajú lineárne konštruované polystyrénové štandardy so známymi molekulovými hmotnosťami M_n a M_w a s úzkou oblasťou distribúcie. Kalibračnú krivku možno použiť na stanovenie molekulovej hmotnosti neznámej vzorky iba vtedy, ak sa pri separácii štandardov aj neznámej vzorky použijú úplne rovnaké podmienky.

Vzťahy stanovené medzi molekulovou hmotnosťou a elučným objemom sú platné iba pri špecifických podmienkach daného pokusu. Medzi tieto podmienky patrí predovšetkým teplota, typ rozpúšťadla (alebo zmesi rozpúšťadiel), chromatografické podmienky a rozdeľovacia kolóna alebo systém kolón.

Takto stanovené molekulové hmotnosti vzoriek predstavujú pomerné hodnoty a označujú sa ako „molekulové hmotnosti polystyrénového ekvivalentu“. Znamená to, že v závislosti od štrukturálnych a chemických rozdielov medzi vzorkou a štandardmi sa môžu molekulové hmotnosti do väčšej alebo menšej miery od svojich absolútnych hodnôt odlišovať. Prípadné použitie iných štandardov, napríklad polyetylénglykolu, polyetylénoxidu, polymetylmetakrylátu alebo kyseliny polyakrylovej, je potrebné odôvodniť.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Distribúciu molekulových hmotností vzorky aj priemerné molekulové hmotnosti (M_n, M_w) možno stanoviť pomocou metódy GPC. Metóda GPC predstavuje osobitný typ kvapalinovej chromatografie, pri ktorej dochádza k rozdeleniu vzorky na základe hydrodynamických objemov jej jednotlivých zložiek (2).

K oddeľovaniu dochádza pri prechode vzorky cez kolónu, ktorá je naplnená poréznym materiálom, ktorým je zvyčajne organický gél. Malé molekuly cez póry prechádzajú, zatiaľ čo veľké molekuly sa z objemu gélu vylučujú. Dráha, ktorú prekonajú veľké molekuly, je preto kratšia a tieto sa vylučujú ako prvé. Molekuly strednej veľkosti do niektorých pórov vnikajú a vylučujú sa z kolóny neskôr. Najmenšie molekuly s hydrodynamickým priemerom menším, ako je veľkosť pórov gélu, môžu vnikať do všetkých z nich a vylučujú sa ako posledné.

V ideálnych podmienkach závisí oddeľovanie výlučne od veľkosti jednotlivých molekúl, no v praxi býva ťažké vyhnúť sa aspoň určitej interferencii absorpčných vplyvov. Situácia sa môže zhoršiť aj v dôsledku nerovnomerného naliatia kolóny a mŕtvych objemov (2).

Detekciu možno uskutočňovať napríklad pomocou merania indexu lomu alebo UV-absorpcie eluátov. Na základe takýchto údajov je možné zostrojiť jednoduchú distribučnú krivku. Molekulové hmotnosti možno bodom na distribučnej krivke prisúdiť iba po predchádzajúcom okalibrovaní kolóny. Robí sa to tak, že na kolónu sa nanesú polyméry so známou molekulovou hmotnosťou, v ideálnom prípade aj s približne podobnou štruktúrou, napríklad rozličné polystyrénové štandardy. Zvyčajne sa získava gaussovská krivka, ktorá býva niekedy na strane nízkych molekulových hmotností mierne pretiahnutá. Zvislá os udáva hmotnostné množstvo jednotlivých typov molekúl vyplavených z kolóny, vodorovná os je vyjadrená ako dekadický logaritmus molekulovej hmotnosti.

▼B

Obsah zložiek s nízkou molekulovou hmotnosťou sa odvádza z tejto krivky. Výpočet môže byť presný iba vtedy, ak zložky s nízkou molekulovou hmotnosťou ekvivalentne na hmotnostnom základe zodpovedajú polyméru ako celku.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Reprodukovateľnosť (relatívna štandardná odchýlka, RSD) elučného objemu by mala byť lepšia ako 0,3 %. Ak sa chromatogram vyhodnocuje nezávisle od času a ak nespĺňa vyššie uvedené kritérium, potom je potrebné zabezpečiť reprodukovateľnosť analýzy pomocou vnútorného štandardu (1). Polydisperzita závisí od molekulových hmotností štandardov. V prípade polystyrénových štandardov sú typické tieto hodnoty:

$M_p < 2\,000$	$M_w/M_n < 1{,}20$
$2\,000 \leq M_p \leq 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}05$
$M_p > 10^6$	$M_w/M_n < 1{,}20$

(M_p je molekulová hmotnosť štandardu v maxime píku)

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. **Príprava štandardných roztokov polystyrénu**

Polystyrénové štandardy sa rozpustia opatrným miešaním vo zvolenom elučnom činidle. Pri príprave roztokov sa treba riadiť odporúčaniami výrobcov.

Voľba koncentrácií štandardov závisí od rozličných faktorov, napríklad od nanášacieho objemu, viskozity roztoku a citlivosti analytického detektora. Maximálny nanášací objem sa musí prispôsobiť dĺžke kolóny, aby nedochádzalo k jej preťaženiu. Zvyčajné nanášacie objemy pri analytických separáciách pomocou GPC sa pri kolóne s rozmerom 30 cm × 7,8 mm pohybujú v rozmedzí 40 µl až 100 µl. Je možné použiť aj vyššie objemy, nemali by však presiahnuť 250 µl. Pred samotnou kalibráciou kolóny je potrebné určiť optimálny pomer medzi nanášacím objemom a koncentráciou nanášanej vzorky.

1.6.2. **Príprava roztoku vzorky**

V zásade rovnaké požiadavky sa vzťahujú aj na prípravu roztokov vzoriek. Vzorka sa opatrným potriasaním rozpustí vo vhodnom rozpúšťadle, napríklad v tetrahydrofuráne (THF). V žiadnom prípade ju nemožno rozpúšťať v ultrazvukovom kúpeli. V prípade potreby sa vzorka prečistí filtráciou cez membránový filter s veľkosťou pórov medzi 0,2 µm a 2 µm.

V záverečnej správe je potrebné zmieniť sa o prítomnosti nerozpustených tuhých častíc, ktoré môžu byť dôsledkom prítomnosti vysokých molekulových hmotností. Percentuálne zastúpenie hmotnosti rozpustených čiastočiek je potrebné určiť pomocou primeranej metódy. Roztoky sa musia použiť do 24 hodín.

▼B

1.6.3. **Korekcia na obsah nečistôt a prímesí**

Zvyčajne je potrebné vykonať korekciu na obsah molekúl s molekulovou hmotnosťou M < 1 000, ktorými prispievajú zložky nepolymérovej povahy (napríklad nečistoty, resp. prímesi). Korekciu netreba vykonať v prípade, ak je ich nameraný obsah nižší ako 1 %. Na tento účel možno analyzovať priamo roztok polyméru alebo GPC eluát.

V prípadoch, v ktorých je eluát po prechode cez kolónu na vykonanie ďalšej analýzy príliš zriedený, treba ho koncentrovať. Môže byť potrebné eluát odpariť dosucha a opätovne rozpustiť. Koncentrovanie eluátu treba vykonať za takých podmienok, ktoré zaručia, že v ňom neprebehnú žiadne zmeny. Spracovanie eluátu po GPC závisí od analytickej metódy, ktorá sa použije na kvantitatívne stanovenie.

1.6.4. **Prístrojové vybavenie**

Prístrojové vybavenie GPC zahŕňa tieto zložky:

— nádrž na rozpúšťadlo,

— zariadenie na odplyňovanie kvapalín (ak je potrebné),

— čerpadlo,

— tlmič pulzov kvapaliny (ak je potrebný),

— nanášací systém,

— chromatografické kolóny,

— detektor,

— prietokomer (ak je potrebný),

— zariadenie na zaznamenávanie a spracúvanie údajov,

— nádoba na odpad.

Treba zabezpečiť inertnosť systému GPC voči používaným rozpúšťadlám (napríklad použitím oceľových kapilár, ak je rozpúšťadlo THF).

1.6.5. **Nanášací systém a systém na privádzanie rozpúšťadla**

Buď pomocou automatického nanášacieho zariadenia, alebo ručne sa na kolónu nanesie v ostro vymedzenej zóne definované množstvo roztoku vzorky. Príliš rýchle vytiahnutie striekačky alebo stlačenie jej piestu pri ručnom nanášaní vzorky môže spôsobiť zmeny v pozorovanej distribúcii molekulových hmotností. Systém na privádzanie rozpúšťadla by nemal spôsobovať pulzové vlny, čo možno v ideálnom prípade zabezpečiť zaradením tlmiča pulzov. Rýchlosť prietoku sa pohybuje okolo hodnoty 1 ml/min.

1.6.6. **Kolóna**

V závislosti od vzorky možno polymér charakterizovať buď pomocou jedinej kolóny, alebo pomocou viacerých za sebou spojených kolón. Ako náplň kolóny je komerčne dostupných viacero poréznych materiálov s definovanými vlastnosťami (napríklad veľkosť pórov, limit vylučovania). Voľba separačného gélu a dĺžky kolóny závisí od vlastností vzorky (hydrodynamické objemy, distribúcia molekulových hmotností) aj od špecifických podmienok pri separácii, napríklad od typu rozpúšťadla, teploty a rýchlosti prietoku (1) (2) (3).

▼B

1.6.7. **Teoretické poschodia kolóny**

Kolóna alebo kombinácia viacerých kolón používaných pri separácii musí byť charakterizovaná počtom teoretických poschodí. V prípade THF ako rozpúšťadla sa to robí tak, že na kolónu so známou dĺžkou sa nanesie roztok etylbenzénu alebo iného vhodného nepolárneho rozpúšťadla. Počet teoretických poschodí udáva táto rovnica:

$$N = 5,54 \left(\frac{V_e}{W_{1/2}} \right)^2 \qquad \text{alebo} \qquad N = 16 \left(\frac{V_e}{W} \right)^2$$

kde:

N = počet teoretických poschodí

V_e = elučný objem v maxime píku

W = šírka píku pri základnej čiare

$W_{1/2}$ = šírka píku v polovici jeho výšky

1.6.8. **Účinnosť separácie**

Okrem počtu teoretických poschodí, ktorý určuje šírku pásu, hrá pri separácii úlohu aj jej účinnosť, ktorá sa určuje na základe strmosti kalibračnej krivky. Účinnosť separácie kolóny možno získať z tohto vzťahu:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{veľkosť plochy prierezu kolóny}} \geq 6,0 \left[\frac{cm^3}{cm^2} \right]$$

kde:

$V_{e,\,Mx}$ = elučný objem polystyrénu s molekulovou hmotnosťou M_x

$V_{e,(10.Mx)}$ = elučný objem polystyrénu s desaťnásobne väčšou molekulovou hmotnosťou

Rozlíšiteľnosť systému sa zvyčajne definuje takto:

$$R_{1,2} = 2 \times \frac{V_{e1} - V_{e2}}{W_1 + W_2} \times \frac{1}{\log_{10}(M_2/M_1)}$$

kde:

V_{e1}, V_{e2} = elučné objemy dvoch polystyrénových štandardov v maxime píku

W_1, W_2 = šírky píkov pri základnej čiare

M_1, M_2 = molekulové hmotnosti v maxime píku (mali by sa líšiť o faktor 10).

R-hodnota kolóny musí byť vyššia ako 1,7 (4).

▼B

1.6.9. **Rozpúšťadlá**

Všetky rozpúšťadlá musia mať vysoký stupeň čistoty (pri THF je stupeň čistoty 99,5 %). Zásobník na rozpúšťadlo (v prípade potreby s atmosférou inertného plynu) musí byť dostatočne veľký na to, aby umožnil kalibráciu kolóny a analýzu niekoľkých vzoriek. Pred vháňaním do kolóny treba elučné činidlo zbaviť plynov pomocou čerpadla.

1.6.10. **Kontrola teploty**

Teplota kritických vnútorných zložiek systému (nanášacia slučka, detektor a hadičky) musí byť stála a musí zodpovedať zvolenému rozpúšťadlu.

1.6.11. **Detektor**

Účelom detektora je kvantitatívne zaznamenávanie koncentrácie vzorky eluovanej z kolóny. V záujme eliminácie zbytočného rozširovania píku by mala mať kyveta meracej komôrky detektora čo možno najmenší objem. S výnimkou detektorov založených na rozptyle svetla a viskozitných detektorov by nemal presahovať 10 µl. Ako detekčná metóda sa zvyčajne používa diferenciálna refraktometria. Možno použiť aj iné typy detektorov (napríklad UV/VIS, IR, viskozitný detektor atď.), ak si to vyžaduje osobitný charakter vzorky alebo elučného činidla.

2. **ÚDAJE A PRÍPRAVA TESTOVACEJ SPRÁVY**

2.1. ÚDAJE

Podrobné vyhodnocovacie kritériá a požiadavky vzťahujúce sa na zber a spracúvanie údajov sú uvedené v norme DIN (1).

Pri každej vzorke je potrebné uskutočniť dva nezávislé pokusy. Každý z nich treba analyzovať osobitne.

Pri každom meraní treba udať M_n, M_w, M_w/M_n a M_p. Treba výslovne uviesť, že namerané hodnoty sú pomerné hodnoty, ekvivalentné použitým štandardom.

Po stanovení retenčných objemov alebo retenčných časov (podľa možnosti korigovaných použitím vnútorného štandardu) sa voči jednej z týchto hodnôt nanášajú do grafu hodnoty log M_p (M_p je maximum píku kalibračného štandardu). Na každú dekádu molekulových hmotností treba použiť aspoň dva kalibračné body, na zostrojenie celej kalibračnej krivky, ktorá by mala pokrývať odhadnutú molekulovú hmotnosť vzorky, je potrebných aspoň päť bodov. Koncový bod kalibračnej krivky v oblasti nízkych molekulových hmotností sa definuje pomocou n-hexylbenzénu alebo iného vhodného nepolárneho rozpúšťadla. Pri stanovení sa časť krivky zodpovedajúcej molekulovým hmotnostiam nižším ako 1 000 podľa potreby koriguje na nečistoty a prísady. Nanášacie krivky sa zvyčajne hodnotia pomocou elektronického spracovania údajov. V prípade manuálnej digitalizácie sa možno riadiť dokumentom ASTM D 3536-91 (3).

▼B

V prípade zadržania každého nerozpustného polyméru v kolóne je vysoko pravdepodobné, že jeho molekulová hmotnosť je vyššia ako molekulová hmotnosť rozpustnej frakcie. Výsledkom nevzatia tejto skutočnosti do úvahy môže byť nadhodnotenie zastúpenia zložiek s nízkou molekulovou hmotnosťou. Návod na uskutočnenie korekcie obsahu zložiek s nízkou molekulovou hmotnosťou na nerozpustný polymér je uvedený v dodatku.

Distribučná krivka sa musí znázorniť vo forme tabuľky alebo graficky (diferenciálna frekvencia alebo kumulatívna frekvencia v percentách proti log M). V grafickom znázornení by mal mať jeden poriadok molekulovej hmotnosti dĺžku 4 cm a výška maxima píku by mala byť asi 8 cm. Pri integrálnych distribučných krivkách by mala byť vzdialenosť medzi 0 % a 100 % na osi y približne 10 cm.

2.2. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí obsahovať tieto informácie:

2.2.1. **Testovaná látka:**

— dostupné informácie o testovanej látke (totožnosť, prísady, nečistoty/prímesi),

— opis spracovania vzorky, zistené skutočnosti, problémy.

2.2.2. **Prístroje a zariadenia:**

— zásobník na elučné činidlo, inertný plyn, odplynenie elučného činidla, zloženie elučného činidla, nečistoty/prímesi,

— čerpadlo, tlmič pulzov kvapaliny, nanášací systém,

— rozdeľovacie kolóny (výrobca, všetky informácie o charakteristikách kolón, ako napríklad veľkosť pórov, druh separačného materiálu atď., počet, dĺžka a usporiadanie použitých kolón),

— počet teoretických poschodí kolóny (alebo kombinácie kolón), účinnosť rozdeľovania (rozlišovacia schopnosť systému),

— informácie o symetrii píkov,

— teplota kolóny, spôsob kontroly teploty,

— detektor (princíp merania, typ, objem kyvety),

— prietokomer, ak sa používa (výrobca, princíp merania),

— systém na zaznamenávanie a spracúvanie údajov (hardvér a softvér).

2.2.3. **Kalibrácia systému:**

— podrobný opis metódy použitej na zostrojenie kalibračnej krivky,

▼B

— informácie o kritériách kvality tejto metódy (napríklad korelačný koeficient, odchýlka súčtu štvorcov atď.),

— informácie o všetkých extrapoláciách, predpokladoch a aproximáciách, ktoré sa uskutočnili počas priebehu pokusu a o vyhodnocovaní a spracúvaní údajov,

— všetky merania, ktoré boli použité na zostrojenie kalibračnej krivky, musia byť

  — zdokumentované v tabuľke, ktorá obsahuje tieto informácie pre každý bod merania:

  — názov vzorky,

  — výrobcu vzorky, charakteristické hodnoty štandardov, t. j. M_p, M_n, M_w a M_w/M_n, tak ako ich uvádza výrobca alebo ako boli odvodené z následných meraní, ako aj podrobnosti o metóde stanovenia,

  — nanášací objem a koncentráciu nanesenej vzorky,

  — hodnotu M_p, ktorá bola použitá na kalibráciu,

  — elučný objem alebo opravený retenčný čas nameraný pri maxime píku,

  — M_p vypočítanú v maxime píku,

  — percentuálnu odchýlku vypočítanej hodnoty M_p od kalibračnej krivky.

2.2.4. **Informácie o obsahu polyméru s nízkou molekulovou hmotnosťou:**

— opis metódy, ktorá sa použila na vykonanie analýzy, a spôsobu vykonania pokusu,

— informácie o percentuálnom obsahu molekúl s nízkou molekulovou hmotnosťou (w/w) vzhľadom na celkové množstvo vzorky,

— informácie o percentuálnom obsahu (w/w) nečistôt, prísad a iných molekúl nepolymérovej povahy vzhľadom na celkové množstvo vzorky.

2.2.5. **Vyhodnotenie:**

— vyhodnotenie na základe času: metódy použité na zabezpečenie požadovanej reprodukovateľnosti (korekčná metóda, vnútorné štandardy atď.),

— informácia o tom, či bolo vyhodnotenie vykonané na základe elučného objemu alebo retenčného času,

— informácie o limitoch vyhodnocovania, ak nebola vykonaná úplná analýza píku,

— opis vyrovnávacej/prekladacej metódy, ak sa použila,

— príprava a predbežné spracovanie vzorky,

— prítomnosť nerozpustených čiastočiek, ak boli pozorované,

▼B

— objem (μl) a koncentrácia (mg/ml) nanesenej vzorky,

— opísanie vplyvov, ktoré mohli spôsobiť odchýlku od ideálneho GPC profilu,

— podrobné opísanie modifikácií uskutočnených v testovacej metóde,

— podrobnosti o rozsahu chýb merania,

— všetky iné informácie a pozorované skutočnosti, ktoré by mohli byť významné z hľadiska interpretácie výsledkov.

3. **ODKAZY**

(1) DIN 55672 (1995) Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Tetrahydrofuran (THF) als Elutionsmittel, Teil 1.

(2) Yau, W.W., Kirkland, J.J., and Bly, D.D. eds. (1979). Modern Size Exclusion Liquid Chromatography, J. Wiley and Sons.

(3) ASTM D 3536-91, (1991). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution by Liquid Exclusion Chromatography (Gel Permeation Chromatography-GPC). American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

(4) ASTM D 5296-92, (1992). Standard Test method for Molecular Weight Averages and Molecular Weight Distribution of Polystyrene by High Performance Size- Exclusion Chromatography. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pennsylvania.

▼B

Dodatok

Návod na uskutočnenie korekcie obsahu zložiek s nízkou molekulovou hmotnosťou na nerozpustný polymér

Prítomnosť nerozpustného polyméru vo vzorke spôsobuje úbytok hmotnosti počas analýzy GPC. Nerozpustný polymér sa nevratne zachytáva v kolóne alebo na filtri, zatiaľ čo rozpustná časť vzorky prechádza cez kolónu. Ak je možné určiť alebo merať prírastok indexu lomu (dn/dc) polyméru, potom je možné určiť aj veľkosť straty hmotnosti vzorky v kolóne. V takomto prípade sa uskutočňuje korekcia pomocou externej kalibrácie, pri ktorej sa na kalibrovanie odpovede refraktometra používajú štandardné materiály so známou koncentráciou a známym pomerom dn/dc. V príklade, ktorý je uvedený v ďalšom texte, sa ako štandard použil poly(metyl)metakrylát (pMMA).

Pri externej kalibrácii pre analýzu akrylových polymérov sa ako štandard používa roztok pMMA so známou koncentráciou v tetrahydrofuráne, ktorý sa podrobuje analýze pomocou GPC. Zo získaných údajov sa pomocou tohto vzťahu zistí konštanta refraktometra:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

kde:

K = konštanta refraktometra (v mikrovoltsekundách/ml),

R = nameraná hodnota pre pMMA (v mikrovoltsekundách),

C = koncentrácia štandardu pMMA (mg/ml),

V = objem vzorky nanesenej do refraktometra (ml) a

dn/dc = prírastok indexu lomu pre roztok pMMA v tetrahydrofuráne (v ml/mg).

Pri štandardoch pMMA sa zvyčajne získavajú tieto údaje:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg

Výsledná hodnota $K = 3{,}05 \times 10^{11}$ sa potom použije na vypočítanie teoretickej odpovede detektora, ak ním prejde 100 % naneseného polyméru.

▼B

A.20. ROZPÚŠŤACIE/EXTRAKTÍVNE VLASTNOSTI POLYMÉROV VO VODE

1. METÓDA

Metóda je prevzatá z revidovanej verzie OECD TG 120 (1997). Ďalšie technické informácie sa nachádzajú v odkaze (1).

1.1. ÚVOD

Skôr ako sa pri určitých polyméroch, napríklad emulzných, bude dať použiť metóda, ktorá je opísaná v ďalšom texte, môže byť potrebné vykonať prípravné postupy. Metódu nemožno použiť pri kvapalných polyméroch a pri polyméroch, ktoré pri pokusných podmienkach reagujú s vodou.

V prípadoch, v ktorých nie je metóda praktická alebo uskutočniteľná, možno extrakčné vlastnosti polymérov stanovovať inými metódami, ktoré je potrebné podrobne opísať a ich použitie odôvodniť.

1.2. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Extraktívne vlastnosti polymérov vo vodnom prostredí sa stanovujú pomocou bankovej metódy (pozri A.6 Rozpustnosť vo vode, Banková metóda) s modifikáciami, ktoré sú opísané v ďalšom texte.

1.4. KVALITATÍVNE KRITÉRIÁ

Žiadne.

1.5. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.5.1. Vybavenie

Pre metódu je potrebné toto vybavenie:

— drviace zariadenie, napríklad drvič, na získanie čiastočiek so známou veľkosťou,

— trepacie zariadenie s možnosťou kontrolovania teploty,

— systém membránových filtrov,

— primerané analytické zariadenie,

— štandardizované sitá.

1.5.2. Príprava vzorky

Reprezentatívna vzorka sa najprv rozdrví a pomocou primeraných sít upraví tak, aby sa získali čiastočky s veľkosťou medzi 0,125 mm a 0,25 mm. Počas drvenia môže byť v záujme zachovania stability vzorky potrebné zabezpečiť chladenie. Materiály gumovitej konzistencie možno drviť pri teplote kvapalného dusíka (1).

Ak dosiahnutie uvedeného rozmeru čiastočiek nie je možné, potom je potrebné pokúsiť sa o dosiahnutie ich najmenšieho možného rozmeru a výsledok treba zaznamenať. V testovacom protokole je potrebné uviesť spôsob uskladnenia vzorky pred vykonaním testu.

▼B

1.5.3. **Postup**

Do každej z troch nádob so sklenou zátkou sa naváži 10 g testovanej látky a pridá sa k nim 1 000 ml vody. Ak spracúvanie 10 g testovanej látky nie je z praktického hľadiska možné, potom treba použiť jej najvyššie možné množstvo blízke tejto hodnote a objem vody mu treba príslušným spôsobom prispôsobiť.

Potom sa nádoby tesne uzavrú a nechajú sa premiešavať pri teplote 20 °C. Treba pri tom použiť trepacie alebo miešacie zariadenie pracujúce pri stálej teplote. Po 24 hodinách sa obsah každej nádoby scentrifuguje alebo prefiltruje a pomocou vhodnej analytickej metódy sa v čírej vodnej fáze stanoví koncentrácia polyméru. Ak pre vodnú fázu neexistujú vhodné analytické metódy, potom možno celkovú rozpustnosť/extraktivitu stanoviť na základe suchej hmotnosti zvyšku na filtri alebo suchej hmotnosti scentrifugovanej usadeniny.

Zvyčajne býva potrebné uskutočniť kvantitatívne rozlíšenie medzi nečistotami a prímesami na jednej strane a medzi polymérnymi zložkami s nízkou molekulovou hmotnosťou na druhej strane. V prípade gravimetrických stanovení je tiež dôležité vykonať slepé meranie bez testovacej látky, aby sa vzali do úvahy prímesi/nečistoty, ktoré sa do pokusu zanášajú počas jeho postupu.

Rozpúšťacie/extraktívne správanie polymérov vo vode pri 37 °C pH 2 a pH 9 možno stanoviť rovnakým spôsobom ako pri vykonávaní pokusu pri 20 °C. Požadované hodnoty pH možno dosiahnuť pridaním buď vhodných tlmivých roztokov, alebo vhodných kyselín, alebo zásad, ako sú kyselina chlorovodíková, kyselina octová, hydroxid sodný alebo draselný analytickej čistoty, alebo NH_3.

V závislosti od použitej analytickej metódy treba uskutočniť jeden alebo dva testy. Ak sú na priame analyzovanie obsahu polymérovej zložky vodnej fázy k dispozícii dostatočne špecifické metódy, potom by mal postačovať jediný z horeuvedených testov. Ak však takéto metódy k dispozícii nie sú a stanovenie rozpúšťacích/extraktívnych vlastností polyméru je obmedzené na nepriamu analýzu pomocou stanovenia iba celkového množstva organicky viazaného uhlíka (TOC) vo vodnom extrakte, potom je potrebné uskutočniť prídavný test. Takýto prídavný test je potrebné vykonať v triplikátoch s použitím desaťnásobne menšieho množstva polyméru a rovnakého množstva vody ako pri prvom teste.

1.5.4. **Analýza**

1.5.4.1. *Testy vykonávané s jedným množstvom vzorky*

Môžu existovať metódy na priamu analýzu polymerických zložiek vodnej fázy. Možno uvažovať taktiež o nepriamej analýze rozpustených/extrahovaných zložiek, pri ktorej sa stanovuje celkové množstvo rozpustných čiastočiek, ktoré sa upravuje na obsah zložiek nepolymérovej povahy.

Analýzu celkového obsahu polymérových látok vo vodne fáze možno uskutočniť:

buď pomocou dostatočne citlivej metódy, napríklad:

— pomocou stanovenia TOC, pri ktorom sa vzorka najprv rozloží kyselinou persírovou alebo kyselinou dvojchrómovu za vzniku CO_2, po čom nasleduje stanovenie pomocou IR alebo chemickej analýzy,

▼B

— pomocou atómovej absorpčnej spektrometrie (AAS) alebo na ekvivalentnej metóde založenej na emisii induktívne naviazanej plazmy (Inductively Coupled Plasma, ICP) pri polyméroch s obsahom kremíka alebo kovov,

— pomocou UV absorpcie alebo spektrofluorometrie pri arylových polyméroch,

— LC-MS pri nízkomolekulárnych vzorkách,

alebo pomocou vákuového odparenia vodného extraktu dosucha a následnou spektroskopickou (IR, UV atď.) alebo AAS/ICP analýzou zvyšku.

Ak analýza vodnej fázy ako takej nie je z praktického hľadiska uskutočniteľná, potom treba podrobiť vodný extrakt extrakcii organickým rozpúšťadlom nemiešateľným s vodou, čo môže byť napríklad chlórovaný uhľovodík. Rozpúšťadlo sa potom nechá odpariť a zvyšok sa analyzuje na obsah daného polyméru vyššie uvedeným spôsobom. Všetky zložky takéhoto zvyšku, ktoré sa vyhodnotia ako nečistoty alebo prímesi, je potrebné od výsledku odrátať, aby sa stanovil stupeň rozpustnosti/extrakcie iba samotného polyméru.

Ak je množstvo takýchto materiálov vo vzorke relatívne veľké, potom môže byť potrebné podrobiť zvyšok napríklad analýze pomocou HPLC alebo GC. Umožní to odlíšiť nečistoty od prítomných monomérov alebo ich derivátov, čím sa umožní stanovenie ich skutočného obsahu.

V niektorých prípadoch môže postačovať jednoduché odparenie organického rozpúšťadla dosucha a odváženie zvyšku.

1.5.4.2. *Testy vykonávané s dvoma množstvami vzorky*

Všetky vodné extrakty sa analyzujú na prítomnosť TOC.

Nerozpustená/neextrahovaná časť vzorky sa podrobí gravimetrickému stanoveniu. Ak zostanú po centrifugácii alebo filtrácii obsahu každej banky prichytené na stenách nádoby zvyšky polyméru, potom treba nádobu oplachovať filtrátom dovtedy, kým sa na jej stenách nebude nachádzať žiaden viditeľný zvyšok. Filtrát sa potom podrobí opätovnej centrifugácii alebo filtrácii. Zvyšky, ktoré zostanú na filtri alebo v centrifugačnej kyvete, sa nechajú vysušiť pri 40 °C a odvážia sa. V sušení sa pokračuje až po dosiahnutie konštantnej hmotnosti.

2. **ÚDAJE**

2.1. TESTY VYKONÁVANÉ S JEDNÝM MNOŽSTVOM VZORKY

Je potrebné uviesť jednotlivé výsledky získané pri každej z troch baniek a priemerné hodnoty vyjadrené v jednotkách hmotnosti na objem roztoku (zvyčajne mg/l) alebo v jednotkách hmotnosti na hmotnosť vzorky polyméru (zvyčajne mg/g). Treba uviesť i straty hmotnosti vzorky (vypočítané ako hmotnosť rozpustenej látky vydelená hmotnosťou pôvodnej vzorky). Treba vypočítať relatívne štandardné odchýlky (RSD). Údaje pre celkové množstvo látky (polymér + hlavné prímesi atď.) a iba pre samotný polymér (t. j. po odčítaní príspevku vyššie uvedených prímesí) treba uviesť osobitne.

▼B

2.2. TESTY VYKONÁVANÉ S DVOMA MNOŽSTVAMI VZORKY

Treba uviesť jednotlivé hodnoty TOC vodných extraktov oboch pokusov vykonaných v triplikátoch, vyjadrené v jednotkách hmotnosti na objem rozpúšťadla (zvyčajne mgC/l), ako aj v jednotkách hmotnosti na hmotnosť pôvodnej vzorky (zvyčajne mgC/g).

Z neexistencie rozdielu medzi výsledkami získanými pri vysokom a nízkom pomere vzorka/voda môže vyplývať, že všetky extrahovateľné látky boli skutočne aj extrahované. V takomto prípade nebude priama analýzy zvyčajne potrebná.

Treba uviesť jednotlivé hmotnosti zvyškov vyjadrené ako percentuálny podiel z pôvodnej hmotnosti vzorky. Pri každom z pokusov treba vypočítať priemerné hodnoty. Rozdiely medzi hodnotou 100 a zisteným percentuálnym zastúpením predstavujú percentuálne zastúpenie rozpustenej a extrahovateľnej hmoty v pôvodnej vzorke.

3. **PRÍPRAVA TESTOVACEJ SPRÁVY**

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí obsahovať tieto informácie:

3.1.1. **Testovaná látka:**

— dostupné informácie o testovanej látke (totožnosť, prímesy, nečistoty, obsah nízkomolekulárnych zložiek).

3.1.2. **Pokusné podmienky:**

— opis použitých postupov a pokusných podmienok,

— opis analytických a detekčných metód.

3.1.3. **Výsledky:**

— výsledky týkajúce sa rozpustnosti/extrahovateľnosti v mg/l; jednotlivé a priemerné hodnoty extrakčných testov pri jednotlivých roztokoch, rozdelené podľa obsahu polyméru a nečistôt, prímesí atď.,

— výsledky týkajúce sa rozpustnosti/extrahovateľnosti v mg/g polyméru,

— TOC hodnoty vodných extraktov, hmotnosť rozpusteného podielu a vypočítané percento, ak bolo stanovené,

— pH každej vzorky,

— informácie o hodnotách získaných pri slepých vzorkách,

— ak je potrebné, aj informácie o chemickej nestálosti testovanej látky počas samotného testovania aj analytických postupov,

— všetky informácie, ktoré môžu mať význam pre interpretovanie výsledkov.

4. **ODKAZY**

(1) DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststofferzeugnissen für Prüfzwecke.

▼B

A.21. OXIDAČNÉ VLASTNOSTI (KVAPALINY)

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Táto metóda je určená na meranie potenciálu kvapalnej látky zvýšiť rýchlosť alebo intenzitu horenia horľavej látky alebo tvoriť s horľavou látkou zmes, ktorá sa samovoľne vznieti, keď sa obe látky dôkladne zmiešajú. Zakladá sa na teste OSN pre oxidujúce kvapaliny (1) a je s ním rovnocenná. Metóda A.21 je určená predovšetkým na splnenie požiadaviek nariadenia (ES) č. 1907/2006, vyžaduje sa však porovnanie iba s jednou referenčnou látkou. Ak sa očakáva, že výsledky testu sa použijú na iné účely, môže byť potrebné testovanie a porovnanie s ďalšími referenčnými látkami ([1]).

Tento test nie je potrebné vykonať, ak sa na základe posúdenia štruktúrneho vzorca nepochybne potvrdí, že látka nie je schopná s horľavým materiálom exotermicky reagovať.

Pred uskutočnením testu je užitočné mať predbežné informácie o akýchkoľvek potenciálnych výbušných vlastnostiach látky.

Tento test nie je vhodný pre tuhé látky, plyny, výbušné alebo veľmi horľavé látky, alebo organické peroxidy.

Ak sú pre testovanú látku už dostupné výsledky testu OSN pre oxidujúce kvapaliny, tento test sa nemusí vykonať (1).

1.2. DEFINÍCIE A JEDNOTKY

Priemerný čas zvýšenia tlaku je priemerná hodnota nameraných časov, počas ktorých testovaná zmes spôsobí zvýšenie tlaku od 690 kPa do 2 070 kPa nad atmosférický tlak.

1.3. REFERENČNÁ LÁTKA

Ako referenčná látka sa používa vodný roztok kyseliny dusičnej (65 hmotnostných %, čistota p. a. – analyticky čistý) ([2]).

([1]) Napríklad v rámci transportných predpisov OSN.
([2]) Kyselina sa musí titrovať pred testovaním, aby sa potvrdila jej koncentrácia.

▼B

Nepovinne, ak experimentátor predpokladá, že výsledky tejto skúšky sa môžu prípadne použiť na iné účely ([1]), môže sa tiež vykonať skúška ďalších referenčných látok ([2]).

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Kvapalina, ktorá sa má testovať, sa zmieša s vláknitou celulózou v hmotnostnom pomere 1:1 a zmes sa nadávkuje do tlakovej nádoby. Ak počas zmiešavania alebo dávkovania nastane samovoľné vznietenie, ďalšie testovanie nie je potrebné.

Ak samovznietenie nenastane, vykoná sa celý test. Zmes sa v tlakovej nádobe zahrieva a stanoví sa priemerný čas zvýšenia tlaku od 690 kPa do 2 070 kPa nad atmosférický tlak. Tento čas sa porovná s priemerným časom zvýšenia tlaku pre zmes referenčnej látky (referenčných látok) a celulózy (1:1).

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

V sérii piatich pokusov na jedenej látke by sa ani jeden výsledok nemal odlišovať od aritmetického priemeru o viac ako 30 %. Výsledky, ktoré sa odlišujú od priemeru o viac ako 30 %, sa vylúčia, zdokonalí sa postup zmiešavania a dávkovania a testovanie sa zopakuje.

1.6. OPIS METÓDY

1.6.1. **Príprava**

1.6.1.1. *Horľavá látka*

Ako horľavý materiál sa používa vysušená, vláknitá celulóza s dĺžkou vlákien medzi 50 μm a 250 μm a priemernou hodnotou priemeru 25 μm ([3]). Celulóza sa suší pri 105 °C počas 4 hodín do konštantnej hmotnosti vo vrstve s hrúbkou najviac 25 mm a počas chladnutia a pred použitím sa uchováva v exsikátore so sušidlom. Obsah vody vo vysušenej celulóze by mal byť nižší ako 0,5 % suchej hmotnosti ([4]). Na to, aby sa dosiahla takáto hodnota, sa v prípade potreby čas sušenia predĺži ([5]). Počas skúšky je potrebné používať rovnakú šaržu celulózy.

([1]) Napríklad v rámci transportných predpisov OSN.
([2]) Napr.: 50 hmotnostných % (w/w) perchlórovej kyseliny a 40 hmotnostných % chlorečnanu sodného sa používa v odkaze (1).
([3]) t. j. celulózový prášok z Whatmanovej stĺpcovej chromatografie CF 11, katalógové č. 4021 050.
([4]) Potvrdené (napr.) Karl-Fisherovou titráciou.
([5]) Alternatívne sa môže tento obsah vody tiež dosiahnuť (napr.) zahriatím na 105 °C vo vákuu na 24 h.

▼B

1.6.1.2. *Aparatúra*

1.6.1.2.1. T l a k o v á n á d o b a

Používa sa tlaková nádoba. Nádoba pozostáva z oceľovej tlakovej nádoby valcovitého tvaru s dĺžkou 89 mm a vonkajším priemerom 60 mm (pozri obrázok 1). Dve plochy na protiľahlých stranách sú opracované (zmenšujúc prierez nádoby na 50 mm), aby bolo možné namontovanie zážihového a odvzdušňovacieho nástavca. Nádoba má vnútorný priemer 20 mm a na oboch koncoch je zoslabená do hĺbky 19 mm a opatrená závitom 1" (1 palec) podľa BSP (British Standard Pipe) alebo jeho metrickým ekvivalentom. Snímač tlaku v tvare bočného ramena je priskrutkovaný k zaoblenému povrchu tlakovej nádoby vo vzdialenosti 35 mm od jedného konca a v 90° uhle k opracovaným stranám. Príslušný otvor je vyvŕtaný do hĺbky 12 mm a na konci bočného ramena vybavený závitom na 1/2 podľa BSP (alebo jeho metrickým ekvivalentom). V prípade potreby sa na zabezpečenie plynotesného utesnenia upevní inertné tesnenie. Bočné rameno vyčnieva 55 mm z tlakovej nádoby a má 6 mm vývrt. Koniec bočného ramena je zoslabený a opatrený závitom na pripojenie membránového snímača tlaku. Môže sa použiť akékoľvek zariadenie na meranie tlaku, ktoré je odolné voči pôsobeniu horúcich plynov alebo produktov rozkladu a na rýchlosť zvýšenia tlaku v rozsahu 690 – 2 070 kPa dokáže reagovať za najviac 5 ms.

Koniec tlakovej nádoby, ktorý je ďalej od bočného ramena, je uzatvorený zážihovým nástavcom, ktorý je vybavený dvoma elektródami, jednou izolovanou od telesa nástavca a druhou uzemnenou k nástavcu. Druhý koniec tlakovej nádoby je uzatvorený poistným diskom (kritický tlak približne 2 200 kPa), upevneným v uzatváracom nástavci s 20 mm vývrtom. V prípade potreby sa na zabezpečenie plynotesného utesnenia zážihového nástavca použije inertné tesnenie. Počas používania je zariadenie udržiavané v správnej polohe stojanom (obrázok 2). Zvyčajne sa skladá z podložky z mäkkej ocele s rozmermi 235 mm × 184 mm × 6 mm a zo 185 mm dlhého štvorcového dutého profilu (ďalej len „Š.D.P.“) s rozmermi 70 mm × 70 mm × 4 mm.

Profil je na protiľahlých stranách jedného konca Š.D.P. zrezaný tak, že vznikne konštrukcia s dvoma plochými ramenami, ktoré prečnievajú o 86 mm nad celým rámom profilu. Konce plochých ramien sú zrezané pod uhlom 60° k horizontálnej rovine a privarené k podložke. Na jednej strane vrchného konca základne profilu je vyrezaný 22 mm široký a 46 mm hlboký otvor tak, aby sa pri vložení tlakovej nádoby do rámu profilu stojana dostal prvý zážihový nástavec a aby bočné rameno zapadlo do otvoru. Kus ocele, široký 30 mm a hrubý 6 mm, ktorý má funkciu rozpery, je privarený k dolnej časti vnútornej plochy rámu profilu. Na upevnenie tlakovej nádoby slúžia dve 7 mm prítlačné skrutky, ktoré sú priskrutkované do protiľahlej strany. Zospodu podopierajú tlakovú nádobu dva 12 mm široké pásy 6 mm hrubej ocele, privarené k bočným stranám dosadajúcim na rám profilu.

▼B

1.6.1.2.2. Systém zážihu

Systém zážihu pozostáva z 25 cm dlhého Ni/Cr drôtu, ktorý má priemer 0,6 mm a odpor 3,85 ohm/m. Drôt má špirálovitý tvar s vnútorným priemerom 5 mm a je pripojený k elektródam zážihového nástavca. Špirála musí byť usporiadaná jedným zo spôsobov zobrazených na obrázku 3. Vzdialenosť medzi dnom nádoby a spodnou časťou zážihovej špirály je 20 mm. Ak nie sú elektródy nastaviteľné, konce zážihového drôtu medzi špirálou a dnom nádoby musia byť izolované keramickým obalom. Drôt sa rozžeravuje konštantným prúdom najmenej 10 A.

1.6.2. **Vykonanie testu** ([1])

Kompletne zmontovaná aparatúra so snímačom tlaku a zážihovým systémom, ale bez vloženého poistného disku, sa pripevní na stojan tak, že zážihový nástavec bude v dolnej časti. V sklenenej kadičke sa sklenenou tyčinkou premieša 2,5 g testovanej kvapaliny s 2,5 g sušenej celulózy ([2]). Z bezpečnostných dôvodov sa miešanie vykonáva s ochranným štítom, ktorý je medzi experimentátorom a zmesou. Ak sa počas miešania alebo plnenia zmes vznieti, ďalšie testovanie nie je potrebné. Zmes sa pridáva do tlakovej nádoby v malých dávkach poklepávaním do tlakovej nádoby, pričom sa musí dávať pozor na to, aby zmes dostatočne pokryla zážihovú špirálu a bola s ňou v dobrom kontakte. Je dôležité, aby sa špirála počas dávkovania nezdeformovala, pretože by to mohlo viesť k chybným výsledkom ([3]). Do uzatváracieho nástavca sa vloží poistný disk a nástavec sa pevne zaskrutkuje. Naplnená nádoba sa presunie do stojanu tak, aby bol poistný disk v hornej polohe, umiestni sa vo vhodnom vystuženom digestore alebo v spaľovacej komore. Do zážihového nástavca sa pripojením na externú zásuvku pustí prúd 10 A. Čas medzi začiatkom miešania a zapnutím prúdu by nemal presiahnuť 10 minút.

Signál z tlakového snímača sa zaznamenáva na vhodný systém, ktorý umožňuje meranie a vytváranie permanentného záznamu získaného časového profilu zmeny tlaku (napr. záznamník spojený so zapisovačom). Zmes sa zahrieva dovtedy, kým nepraskne poistný disk alebo neuplynie aspoň 60 s. Ak poistný disk nepraskne, zmes sa pred opatrným rozobratím aparatúry nechá vychladnúť, pričom je potrebné dodržiavať bezpečnostné opatrenia pre prípad možného výskytu zvýšeného tlaku. Vykonáva sa päť pokusov s testovanou látkou a referenčnou látkou (referenčnými látkami). Zaznamenáva sa čas potrebný na zvýšenie tlaku zo 690 kPa na 2 070 kPa nad atmosférický tlak. Vypočíta sa priemerný čas zvýšenia tlaku.

V niektorých prípadoch môžu chemické reakcie látok, ktoré nesúvisia s ich oxidačnými vlastnosťami, spôsobiť (príliš vysoké alebo príliš nízke) zvýšenie tlaku. V takýchto prípadoch môže byť potrebné kvôli objasneniu povahy reakcie zopakovať test s inertnou látkou namiesto celulózy, napr. diatomit (kremelina).

([1]) So zmesami oxidačných činidiel s celulózou sa musí zaobchádzať ako s potenciálne explozívnymi a treba s nimi manipulovať s náležitou pozornosťou.

([2]) V praxi sa to dá dosiahnuť prípravou zmesi testovanej kvapaliny s celulózou v pomere 1:1 vo väčšom množstve, ako je potrebné pre test, a do tlakovej nádoby sa nadávkuje 5 g ± 0,1 g. Pre každý test osobitne sa pripraví čerstvá zmes.

([3]) Je potrebné zabrániť najmä kontaktu medzi susednými závitmi špirály.

▼B

2. **ÚDAJE**

Čas zvýšenia tlaku pre testovanú látku a referenčnú látku (referenčné látky). Čas zvýšenia tlaku pri testoch s inertnou látkou, ak sa realizovali.

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Vypočíta sa priemerný čas zvýšenia tlaku pre testovanú látku a referenčnú látku (referenčné látky).

Vypočíta sa priemerný čas zvýšenia tlaku pri testoch s inertnou látkou, ak sa realizovali.

Niektoré príklady výsledkov sú uvedené v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Príklady výsledkov ([a])

Látka ([b])	Priemerný čas zvýšenia tlaku pre zmes s celulózou v pomere 1:1 (ms)
Dichróman amónny, nasýtený vodný roztok	20 800
Dusičnan vápenatý, nasýtený vodný roztok	6 700
Dusičnan železitý, nasýtený vodný roztok	4 133
Chloristan lítny, nasýtený vodný roztok	1 686
Chloristan horečnatý, nasýtený vodný roztok	777
Dusičnan nikelnatý, nasýtený vodný roztok	6 250
Kyselina dusičná, 65 %	4 767 ([c])
Kyselina chloristá, 50 %	121 ([c])
Kyselina chloristá, 55 %	59
Dusičnan draselný, 30 % vodný roztok	26 690
Dusičnan strieborný, nasýtený vodný roztok	([d])
Chlorečnan sodný, 40 % vodný roztok	2 555 ([c])
Dusičnan sodný, 45 % vodný roztok	4 133
Inertná látka	
Voda: celulóza	([d])

([a]) Priemerná hodnote z medizilaboratórnych porovnácacích skúšok.
([b]) Maximálny tlak 2 070 kPa nedosiahnutý.
([c]) Nasýtené roztoky sa pripravujú pri teplote 20 °C.
([d]) Pozri odkaz (1) na interpretáciu výsledkov podľa transportných predpisov OSN pri použití rôznych referenčných látok.

▼B

3. **SPRÁVA**

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste obsahuje tieto informácie:

— identifikáciu, zloženie, čistotu atď. testovanej látky,

— koncentráciu testovanej látky,

— postup sušenia použitej celulózy,

— obsah vody v použitej celulóze,

— výsledky meraní,

— výsledky testov s inertnou látkou, ak existujú,

— vypočítané priemerné časy zvýšenia tlaku,

— všetky odchýlky od tejto metódy a ich dôvody,

— všetky doplňujúce poznámky a poznámky dôležité pre interpretáciu výsledkov.

3.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV ([1])

Výsledky testov sa vyhodnotia na základe:

a) toho, či sa zmes testovanej látky a celulózy samovoľne vznieti, a

b) porovnania priemerného času potrebného na zvýšenie tlaku od 690 kPa do 2 070 kPa s časom potrebným na zvýšenie tlaku v prípade referenčnej látky (referenčných látok).

Kvapalná látka sa pokladá za oxidačné činidlo, keď:

a) sa zmes látky a celulózy v hmotnostnom pomere 1:1 samovoľne vznieti alebo

b) zmes látky a celulózy v hmotnostnom pomere 1:1 má priemerný čas zvýšenia tlaku menší alebo rovnaký ako priemerný čas zvýšenia tlaku zmesi vodného roztoku kyseliny dusičnej a celulózy (65 hmotnostných %).

Na to, aby bol vylúčený falošný pozitívny výsledok, sa v prípade potreby pri interpretácii výsledkov zoberú do úvahy aj výsledky získané pri testovaní látky s inertným materiálom.

([1]) Pozri odkaz (1) na interpretáciu výsledkov podľa transportných predpisov OSN pri použití rôznych referenčných látok.

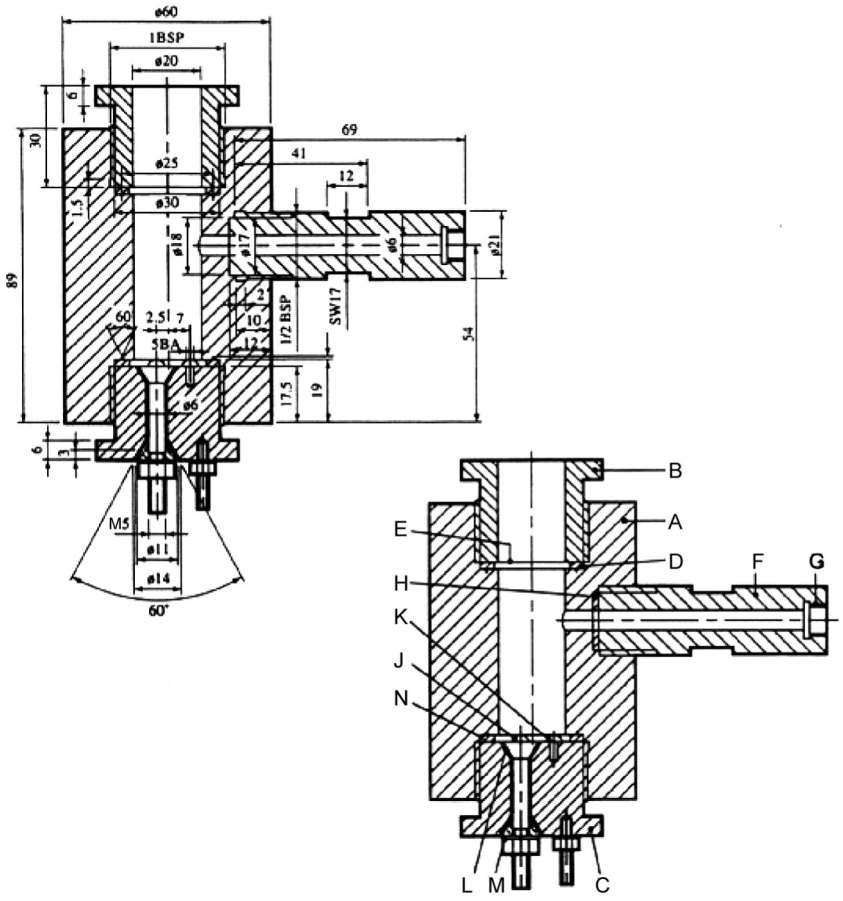
▼B

4. **ODKAZY**

(1) Recommendations on the Transport of Dangerous Goods, Manual of Tests and Criteria. 3rd revised edition. UN Publication No: ST/SG/AC.10/11/Rev. 3, 1999, 342. Test O.2: Test for oxidizing liquids.

Obrázok 1

Tlaková nádoba



(A) Telo tlakovej nádoby

(B) Uzatvárací nástavec s poistným diskom

(C) Zážihový nástavec

(D) Podložka z mäkkého olova

(E) Poistný disk

(F) Bočné rameno

(G) Hlava snímača tlaku

(H) Tesnenie

(J) Izolovaná elektróda

(K) Uzemňovacia elektróda

(L) Izolácia

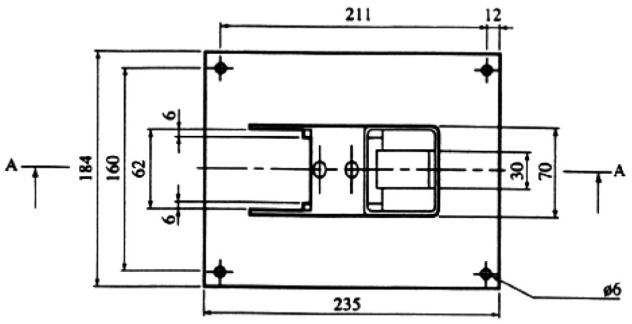
(M) Oceľový kónus

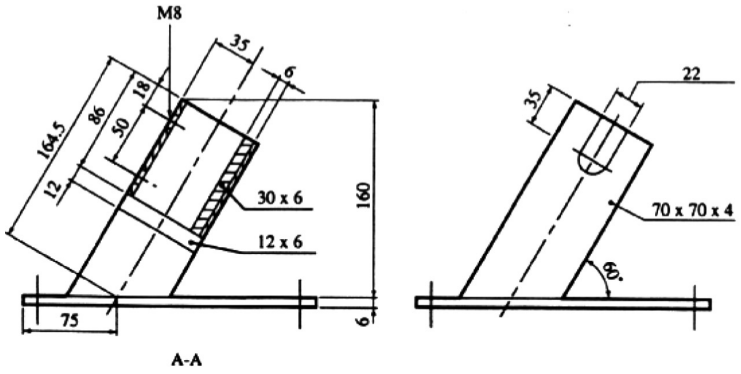
(N) Deformačná drážka tesnenia

▼B

Obrázok 2

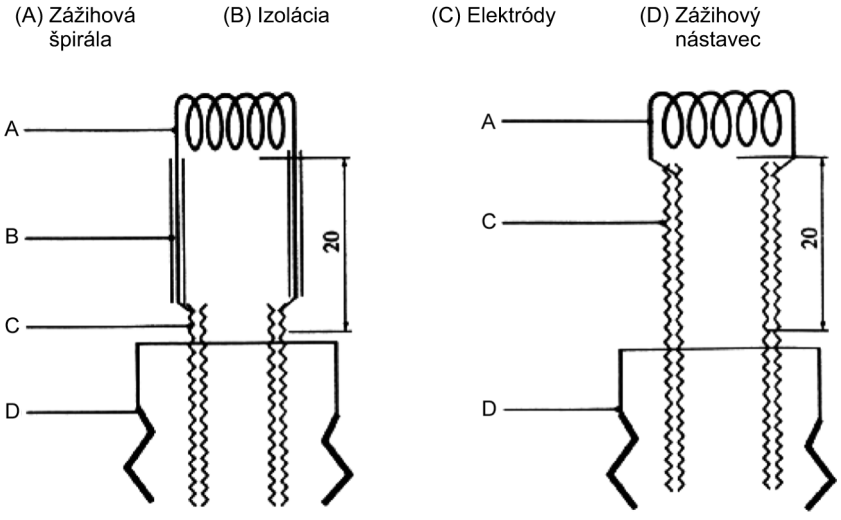
Stojan





Obrázok 3

Systém zážihu



Poznámka: Môže sa použiť ktorákoľvek z týchto zostáv.

▼M1

A.22. DĹŽKOVÁ HODNOTA GEOMETRICKÉHO VYJADRENIA PRIEMERU VLÁKEN

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Táto metóda opisuje postup merania dĺžkovej hodnoty geometrického vyjadrenia priemeru (Length Weighted Geometric Mean Diameter – LWGMD) objemu umelých minerálnych vláken (Man Made Mineral Fibres – MMMF). Keďže hodnota LWGMD štatistického súboru sa bude s 95 % pravdepodobnosťou nachádzať medzi 95 % hladinami spoľahlivosti vzorky (t. j. LWGMD ± 2 štandardné chyby), vykazovaná hodnota (testovacia hodnota) bude na nižšej úrovni 95 % hladiny spoľahlivosti (napríklad LWGMD – dve štandardné chyby). Metóda je založená na aktualizácii (jún 1994) návrhu postupu HSE (Health and Safty Executive – Výkonný výbor pre zdravie a bezpečnosť), ktorý bol prijatý 26. septembra 1993 na stretnutí medzi ECFIA (European Ceramic Fibres Industry Association – Európska asociácia odvetví priemyselných vláken) a HSE v Chesteri a bol vyvinutý pri druhej medzilaboratórnej skúške (1,2). Táto metóda merania sa môže používať na určenie priemeru vlákna látok výrobkov obsahujúcich MMMF vrátane ohňovzdorných keramických vláken (RCF), umelých sklovitých vláken (MMVF), kryštalických a polykryštalických vláken.

Dĺžková hmotnosť vyjadruje nahradenie vplyvu rozloženia na priemer v dôsledku porušenia dlhých vláken počas odoberania, prípadne narábania s materiálom. Geometrická štatistika (geometrická hodnota) sa používa na meranie miery rozloženia MMMF priemerov, pretože tieto priemery mávajú zvyčajne veľkosť rozloženia, ktorá sa približuje k normálnej polohe.

Meranie dĺžky, ako aj priemeru je zdĺhavé a zároveň časovo náročné, ale ak sa merajú len tie vlákna, ktoré sa plynulo dotýkajú tenkou čiarou poľa SEM pohľadu, potom je pravdepodobnosť výberu daného vlákna pomerná k jeho dĺžke. Takto sa určí dĺžka pri výpočtoch dĺžkových hodnôt, pričom jedinou požadovanou hodnotou je veľkosť priemeru, a LWGMD-2SE sa môže vypočítať, ako bolo uvedené.

1.2. POJMY

Zrno: predmet s pomerom dĺžky k šírke menej ako 3:1.

Vlákno: Predmet s pomerom dĺžky k šírke (pomer strán) menej ako 3:1.

1.3. ROZSAH A OBMEDZENIA

Metóda sa zameriava na zobrazenie rozloženia priemeru, ktorý má strednú hodnotu od 0,5 μm do 6 μm. Väčšie priemery sa môžu zmerať s použitím menšieho zvýšenia SEM, ale táto metóda bude značne obmedzená pri jemnejšom rozložení vlákna a meranie pomocou TEM (mikroskop prenosu elektrónov) sa odporúča v prípade, ak je stredná hodnota priemeru nižšia ako 0,5 μm.

▼M1

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Určité množstvo reprezentatívnej vzorky sa odoberie z vlákninovej zóny alebo voľne uloženého vlákna. Voľné vlákna sa skrátia s použitím postupu drvenia a reprezentatívna časť vzorky sa rozptýli vo vode. Hmota sa potom oddelí a prefiltruje polykarbonátovým filtrom cez sito s okami veľkosti 0,2 μm a pripraví na skúšku s použitím techniky skenovacieho elektrónového mikroskopu (SEM). Priemer vláken sa odmeria na 10 000-násobne zväčšenej obrazovke, prípadne väčšom zväčšení ([1]) s použitím metódy priesečníka, ktorá poskytne nestranný odhad strednej hodnoty priemeru. Vypočíta sa spodná hodnota 95 % intervalu spoľahlivosti (na základe jednostranného testu) a stanoví sa odhad najnižšej hodnoty geometrického vyjadrenia priemeru vláken materiálu.

1.5. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.5.1. **Bezpečnostné opatrenia**

Priamy kontakt s jemnými vláknami sa musí obmedziť na minimum a pri narábaní so suchými vláknami je nutné používať digestor alebo odkladaciu skrinku. Pravidelné monitorovanie kontaktu s látkami sa vykonáva na účel stanovenia efektívnosti kontrolných metód. Pri narábaní s MMMF je nevyhnutné používať rukavice na jednorazové použitie, aby sa predišlo podráždeniu pokožky a zabránilo krížovej kontaminácii (nakazeniu).

1.5.2. **Prístroje/zariadenia**

— lis a farbivo (schopný vyprodukovať tlak 10 Mpa),

— polykarbonátové kapilárne pórovité filtre s veľkosťou pórov 0,2 μm (priemer 25 mm),

— membránový celulózový filter s veľkosťou pórov 5 μm, určený ako pomocný filter,

— sklený filtračný prístroj (alebo jednorazové filtračné systémy) umožňujúce požitie filtrov s priemerom 25 mm (napríklad milipórová sklená mikroanalýzová sada, typ č. XX10 025 00),

— čistá destilovaná voda získaná prefiltrovaním cez filter s veľkosťou pórov 0,2 μm na účely odstránenia mikroorganizmov,

— katódový rozprašovač s anódou zo zlata, prípadne zo zlata či paládia,

— skenovací (rastrovací) elektrónový mikroskop s rozlišovacou schopnosťou do 10 nm a pracujúci s 10 000-násobným zväčšením,

— rôzne: stierky, skalpel s čepeľou typu 24, klieštičky, SEM tubusy, karbónové lepidlo alebo karbónová lepiaca páska, strieborný skalpel,

— ultrazvuková sonda alebo ultrazvuková vanička na doske laboratórneho stola,

— odoberač vzorky sedimentov alebo korkovrt na odoberanie vzoriek z pokrývky MMMF.

([1]) Táto hodnota zväčšenia sa uvádza pre vlákna s priemerom 3 μm, pre vlákna s priemerom 6 μm je vhodnejšie 5 000-násobné zväčšenie.

▼M1

1.5.3. **Postup pri teste**

1.5.3.1. *Odber vzoriek*

Pri vrchných vrstvách sa na odoberanie vzoriek profilu použije 25 mm odoberač vzorky sedimentov alebo korkovrt. Mali by byť rovnomerne rozmiestnené po šírke z kratšej strany vrstvy alebo v prípade, že sú k dispozícii dlhé dĺžky vrstiev, sa odoberú z náhodných častí. Rovnaké zariadenie možno použiť na náhodné odoberanie vzoriek z uvoľnených vláken. Malo by sa odobrať šesť vzoriek, aby sa zohľadnili priestorové odchýlky objemu materiálu.

Šesť vzoriek jadra sa pod tlakom 10 Mpa rozdrví v lisovadle s priemerom 50 mm. Materiál sa rozmieša pomocou stierky a znovu sa lisuje pod tlakom 10 Mpa. Potom sa materiál odoberie z lisovadla a uskladní v hermeticky uzatvorenej sklenej fľaši.

1.5.3.2. *Príprava vzorky*

V nutnom prípade sa organický tmel odstráni umiestnením vlákna dovnútra pece pri teplote 450 °C počas približne jednej hodiny.

Vytvarujte vzorku do kužeľa a rozštvrťte ju (vykonáva sa vnútri prachovej skrinky).

S použitím stierky pridajte malé množstvo (< 0,5 g) vzorky do 100 ml čerstvo destilovanej vody, ktorá bola prefiltrovaná pomocou membránového filtra veľkosti 0,2 μm (ak sa použitie ukáže opodstatnené, možno použiť náhradný zdroj ultračistej vody). Dôkladne rozmiešajte s použitím ultrazvukovej sondy poháňanej 100 W zdrojom a nastavenej tak, aby sa vytvorila kavitácia. (V prípade, že sonda nie je k dispozícii, použite nasledujúcu metódu: 30 sekúnd ju treba opakovane triasť a obracať; nechať 5 minút pôsobiť pod ultrazvukom umiestnením v stolnej ultrazvukovej vaničke; potom opakovane triasť a obracať počas ďalších 30 sekúnd.)

Okamžite po rozptýlení vlákna je potrebné odobrať niekoľko častíc (napríklad tri pomerné časti 3,6 a 10 ml) pomocou širokootvorovej pipety (s objemom 2 – 5 ml).

Prefiltrujte každú časť cez polykarbonátový filter veľkosti otvorov 0,2 μm s pomocou MEC filtru veľkosti pórov 5 μm s použitím 25 ml skleného filtrovacieho lievika s valcovitým zásobníkom. Približne 5 ml prefiltrovanej destilovanej vody by sa malo umiestniť do lievika a častica sa pomaly prekvapkáva do vody, držiac konček pipety pod ohybom. Pipeta a zásobník sa po prekvapkávaní musia riadne prepláchnuť z toho dôvodu, že vlákna sa zvyčajne nachádzajú viac na povrchu.

Opatrne odoberte filter a pred umiestnením do sušiacej nádoby ho oddeľte od podporného filtra.

▼M1

Kmitavým pohybom narežte štvrtinu alebo polovicu z prefiltrovanej hmoty s použitím skalpovacej čepele typu 24. Opatrne pripevnite oddelenú časť k bloku SEM s s použitím lepiaceho uhlíkového štítka alebo uhlíkového lepidla. Použite strieborný skalpel najmenej v troch polohách tak, aby sa zlepšil elektrický kontakt okrajov filtra a ústrižku. Keď lepidlo/strieborný skalpel oschne, obaľte katódu vrstvou 50 nm zlata, prípadne zmesou zlata/paládia na povrchu usadeniny.

1.5.3.3. *SEM kalibrácia a postup*

1.5.3.3.1. K a l i b r á c i a

SEM kalibráciu je potrebné skontrolovať najmenej raz do týždňa (najlepšie každodenne) s použitím certifikovanej kalibračnej mriežky. Kalibráciu je nutné porovnať s certifikovanou normou a v prípade, ak meraná hodnota (SEM) nie je v rozpätí ± 2 % certifikovanej hodnoty, musí sa kalibrácia SEM upraviť a znovu skontrolovať.

SEM by malo byť schopné rozpustiť prinajmenšom viditeľný priemer 0,2 μm s použitím absolútnej vzorkovej matrice pri 2 000-násobnom zväčšení.

1.5.3.3.2. P r a c o v n ý p o s t u p

Proces SEM sa vykonáva pri 10 000-násobnom zväčšení ([1]) za podmienok, ktoré umožňujú dobrú rozlíšiteľnosť prostredníctvom obrazu pri nízkych hodnotách skenovania, napríklad 5 sekúnd na snímku. Napriek tomu, že pracovné podmienky pri rôznych SEM sa môžu odlišovať, všeobecne platí, že na získanie najlepšej viditeľnosti a rozlíšenia je pri použití relatívne malého objemu hmoty atómov potrebné použiť zvyšujúce sa napätie od 5 – 10 keV pomocou malého bodového nastavenia a krátkej prevádzkovej vzdialenosti. Pri realizácii lineárneho priečneho pohybu sa musí použiť 0^{o} sklon na účely minimalizovania opätovného zaostrenia alebo ak sa SEM nachádza v eucentrickej polohe, použije sa eucentrická prevádzková vzdialenosť. Menšie zväčšenie možno použiť v prípade, ak materiál neobsahuje vlákna s malým priemerom, a pre vlákna s väčším priemerom (> 5 μm).

1.5.3.4. *Meranie veľkosti*

1.5.3.4.1. Z h o d n o t e n i e v z o r k y p r e s k ú š a n í m p r i m a l o m z v ä č š e n í

Najskôr sa vzorka preskúša pri malom zväčšení, aby sa zistil zhluk väčších vláken a ich hustota. V prípade nadmerného zhlukovania vláken sa odporúča pripraviť novú vzorku.

Štatistická presnosť si vyžaduje meranie minimálneho počtu vláken, pričom vysoká hustota vláken je výhodnejšia, pretože preskúšavanie prázdnych polí je časovo náročné a nepredstavuje prínos k celkovej analýze. Ak je filter preplnený, meranie všetkých merateľných vláken sa stáva náročným a malé vlákna môžu byť vynechané, lebo sú prekryté väčšími.

([1]) Pri vláknach 3 μm pozri predchádzajúcu poznámku.

▼M1

Ku skresleniu výsledkov nadhodnotením LWGMD môže dôjsť, ak je hustota vláken väčšia ako 150 vláken na milimeter lineárneho priečneho posunu. Na druhej strane nízka koncentrácia vláken zvyšuje čas analýzy a často je efektívnejšie pripraviť vzorku s hustotou vláken bližšou optimálnej hodnote, ako sa spoliehať na vlákna s nízkou koncentráciou. Optimálna hustota vláken sa určuje na základe priemeru jedného alebo dvoch počítateľných vláken na polia zo záberu pri 5 000-násobnom zväčšení. Napriek tomu optimálna hustota závisí od veľkosti (priemeru) vláken, takže laborant pri rozhodovaní, či hustota vlákna je blízko k optimálnej hodnote, alebo nie, musí použiť vlastný odborný úsudok.

1.5.3.4.2. Meranie dĺžky priemeru vláken

Počítajú sa iba tie vlákna, ktoré sa dotýkajú (alebo prečnievajú) tenkej (plynulej) čiary naznačenej na obrazovke SEM. Na tento účel sa nakreslí horizontálna (alebo vertikálna) čiara idúca stredom obrazovky.

Alternatívou sa ukazuje byť možnosť umiestnenia jednotlivého bodu do stredu obrazovky s plynulým skenovaním jedným smerom krížom cez celý filter. Každé vlákno s koeficientom s priemerom 3:1, ktoré sa dotýka tohto bodu alebo ho presahuje, sa potom zmeria a zaznamená.

1.5.3.4.3. Triedenie vláken

Odporúča sa odmerať minimálne 300 vláken. Každé vlákno sa odmeria iba raz v priesečníku s čiarou alebo bodom nakresleným na obraze (alebo blízko k priesečníku, ak sú okraje vlákna prekryté). Ak sa objavia vlákna, ktoré majú nerovnomerné priečne rezy, je potrebné použiť rozmer reprezentujúci priemernú hodnotu priemeru vlákna. Opatrne treba určiť presný okraj a odmerať najkratšiu vzdialenosť medzi okrajmi vlákna. Triedenie možno realizovať online alebo offline s použitím uložených obrázkov alebo fotografií. Vzhľadom na úsporu času a zamedzenie chýb pri prepise, ako aj kvôli zautomatizovaniu samotného výpočtu sa odporúča použiť poloautomatizovaný snímkovací systém merania, ktorý je schopný stiahnuť údaje priamo do tabuľkovej formy.

Konce dlhých vláken je potrebné preveriť pri nízkej hodnote zväčšenia, aby sa zamedzilo ich opätovnému zvlneniu do zorného poľa merania a zabezpečilo, že sa odmerajú iba raz.

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Priemery vláken zvyčajne nemajú normálne rozloženie. Napriek tomu možno získať pri logaritmickej transformácii rozloženie, ktoré sa približuje k normálnemu stavu.

Výpočet aritmetickej hodnoty (stredná hodnota lnD) a štandardnej odchýlky (SD_{lnD}) od prenosu základne hodnôt e (lnD) z priemerov vláken (D).

$$\text{stredná lnD} = \frac{\sum \text{lnD}}{\text{n}} \qquad (1)$$

▼**M1**

$$SD_{lnD} = \sqrt{\frac{\sum(lnD - \text{stredná } lnD)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Štandardná odchýlka sa vydelí druhou odmocninou počtu meraní (n), čím vyrátame štandardnú chybu (SE_{lnD}).

$$SE_{lnD} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Odpočítajte dvakrát štandardnú chybu od hodnoty a vypočítajte exponenciál tejto hodnoty (stredná hodnota mínus dve štandardné chyby) a dostanete strednú geometrickú hodnotu mínus dve štandardné chyby.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{stredná } lnD - 2SE_{lnd})} \quad (4)$$

3. **NAHLASOVANIE SPRÁV**

PROTOKOL O TESTE

Protokol o teste musí obsahovať aspoň nasledujúcu informáciu:

— hodnotu LWGMD-2SE,

— všetky odchýlky a zvlášť tie, ktoré môžu mať vplyv na presnosť a správnosť výsledkov s patričným zdôvodnením.

4. **LITERATÚRA**

1. B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. February 1999.

2. G. Burdett and G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weigthed geometric mean fibre diameter: Results of the Second inter-laboratory exchange. IR/L/MF/94/-07. Project R42.75 HPD. Health and Safety Executive. Research and Laboratory Services Division, 1994.

▼M4

A.23. ROZDEĽOVACÍ KOEFICIENT (1-OKTANOL/VODA): METÓDA POMALÉHO MIEŠANIA

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s Usmerneniami OECD na vykonávanie testov (TG) 123 (2006). Hodnoty rozdeľovacieho koeficientu 1-oktanol/voda (P_{ow}) až po log P_{ow} 8,2 boli presne stanovené metódou pomalého miešania (1). Ide preto o vhodný experimentálny prístup pre priame stanovenie P_{ow} vysoko hydrofóbnych látok.

2. Inými metódami na stanovenie rozdeľovacieho koeficientu 1-oktanol/voda (P_{ow}) sú metóda trepačkovej banky (2) a stanovenie P_{ow} z retenčného správania HPLC s reverznou fázou (3). Pri metóde trepačkovej banky sa zvyknú tvoriť vedľajšie produkty z dôvodu prenosu oktanolových mikrokvapôčok do vodnej fázy. S narastajúcimi hodnotami P_{ow} vedie prítomnosť týchto kvapôčok vo vodnej fáze k čoraz vyššiemu nadhodnoteniu koncentrácie testovanej látky vo vode. Preto sa jej použitie obmedzuje na látky s log $P_{ow} < 4$. Druhá metóda sa opiera o spoľahlivé údaje priamo stanovených hodnôt P_{ow} na kalibráciu vzťahu medzi retenčným správaním HPLC a meranými hodnotami P_{ow}. Na stanovenie rozdeľovacích koeficientov 1-oktanol/voda ionizovateľných látok (4) bolo možné použiť predbežné usmernenia OECD, ktoré sa však už nebudú používať.

3. Túto testovaciu metódu vyvinuli v Holandsku. Presnosť metód, ktoré sú tu opísané, bola potvrdená a optimalizovaná v rámci hodnotiacej štúdie kruhového testu, na ktorej sa zúčastnilo 15 laboratórií (5).

ÚVODNÉ ÚVAHY

Význam a použitie

4. V prípade inertných organických látok boli zistené veľmi dôležité vzťahy medzi rozdeľovacími koeficientmi 1-oktanol/voda (P_{ow}) a ich bioakumuláciou v rybách. Okrem toho sa preukázala korelácia P_{ow} s toxicitou rýb, ako aj sorpcia chemikálií do tuhých látok, ako je zemina a sedimenty. Rozsiahly prehľad vzťahov sa uvádza v odkaze (6).

5. Medzi rozdeľovacím koeficientom 1-oktanol/voda a vlastnosťami iných látok bola zistená široká škála vzťahov, ktoré majú význam pre environmentálnu toxikológiu a chémiu. V dôsledku toho sa rozdeľovací koeficient 1-oktanol/voda stal kľúčovým parametrom pri hodnotení environmentálneho rizika chemikálií, ako aj pri predpovedaní osudu chemikálií v životnom prostredí.

Rozsah

6. Pri pokuse pomalého miešania sa predpokladá nižšia tvorba mikrokvapôčok z kvapiek 1-oktanolu vo vodnej fáze. Následne nedochádza k nadhodnoteniu vodnej koncentrácie v dôsledku molekúl testovanej látky, ktoré súvisí s takýmito kvapôčkami. Metóda pomalého miešania je preto veľmi vhodná na stanovenie P_{ow} látok s predpokladanými hodnotami log P_{ow} rovnajúcimi sa 5 alebo vyššími, v prípade ktorých zvykne metóda trepačkovej banky (2) viesť k chybným výsledkom.

▼M4

VYMEDZENIE POJMU A JEDNOTKY

7. Rozdeľovací koeficient látky medzi vodou a lipofilickým rozpúšťadlom (1-oktanol) charakterizuje rozloženie rovnováhy chemikálie medzi dvoma fázami. Rozdeľovací koeficient medzi vodou a 1-oktanolom (P_{OW}) je vymedzený ako pomer rovnovážnych koncentrácií testovanej látky v 1-oktanole nasýtenom vodou (C_O) a vo vode nasýtenej 1-oktanolom (C_W).

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Keďže ide o pomer, je to bezrozmerné číslo. Najčastejšie sa udáva ako logaritmus pri základe 10 (log P_{ow}). P_{ow} závisí od teploty a údaje v správe by mali zahŕňať teplotu merania.

PRINCÍP METÓDY

8. Na účely stanovenia rozdeľovacieho koeficientu sa voda, 1-oktanol a testovaná látka navzájom vyvážia pri konštantnej teplote. Následne sa určia koncentrácie testovanej látky v dvoch fázach.

9. Problémy pokusu súvisiace s tvorbou mikrokvapôčok počas pokusu s trepaním banky je možné znížiť pri pokuse s pomalým miešaním, ktorý sa v tomto texte navrhuje. V prípade pokusu s pomalým miešaním sa voda, 1-oktanol a testovaná látka vyvážia v termostatickom miešanom reaktore. Výmena medzi fázami sa urýchli miešaním. Miešaním dochádza k malej turbulencii, ktorá napomáha výmene medzi 1-oktanolom a vodou bez vytvárania mikrokvapôčok (1).

POUŽITEĽNOSŤ TESTU

10. Keďže prítomnosť látok iných ako testovaná látka môže ovplyvniť koeficient aktivity testovanej látky, testovaná látka sa musí testovať ako čistá látka. Pri pokuse stanovenia rozdeľovacieho koeficientu 1-oktanol/voda sa použije komerčne dostupná látka najvyššej čistoty.

11. Uvedená metóda sa vzťahuje na čisté látky, ktoré nedisociujú ani sa nespájajú a ktoré nevykazujú významnú medzipovrchovú aktivitu. Možno ju použiť na stanovenie rozdeľovacieho koeficientu 1-oktanol/voda takýchto látok a zmesí. Ak sa metóda použije v prípade zmesí, stanovené rozdeľovacie koeficienty 1-oktanol/voda sú závislé od chemického zloženia testovanej zmesi a elektrolytického zloženia vo vodnej fáze. Za predpokladu, že sa prijmú dodatočné opatrenia, možno metódu použiť aj na disociujúce alebo spájajúce sa zlúčeniny (odsek 12).

12. Vzhľadom na viacnásobné rovnovážne stavy vo vode a 1-oktanole, ktoré prispievajú k deleniu disociujúcich látok v systéme 1-oktanol/voda, ako sú organické kyseliny a fenoly, organické bázy a organokovové látky, je rozdeľovací koeficient 1-oktanol/voda závislou konštantou, ktorá vo veľkej miere závisí od elektrolytického zloženia (7) (8). Stanovenie rozdeľovacieho koeficientu 1-oktanol/voda preto vyžaduje, aby sa pH a elektrolytické zloženie počas pokusu kontrolovali a zaznamenali v správe. Pri hodnotení týchto rozdeľovacích koeficientov je potrebné opierať sa o odborný posudok. Pomocou hodnoty disociačnej konštanty (disociačných konštánt) je potrebné vybrať vhodné hodnoty pH, aby sa pre každý ionizačný stav stanovil rozdeľovací koeficient. Pri testovaní organokovových zlúčenín (8) sa musia použiť nekomplexujúce tlmivé roztoky. Pri zohľadnení existujúcich znalostí o roztokovej chémii (konštanty stability komplexu, disociačné konštanty) by sa podmienky pokusu mali zvoliť takým spôsobom, aby bolo možné odhadnúť zloženie testovanej látky vo vodnej fáze. Iónová sila by mala byť totožná pri všetkých pokusoch vzhľadom na použitie základného elektrolytu.

▼M4

13. Pri teste sa môžu vyskytnúť problémy v prípade testovania látok s nízkou rozpustnosťou vo vode alebo s vysokým P_{ow}, lebo koncentrácie vo vode sú také nízke, že je náročné ich stanoviť s presnosťou. V rámci tejto testovacej metódy sa uvádzajú usmernenia, ako tento problém riešiť.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

14. Chemické reagenty musia mať stupeň čistoty – analyticky čistá alebo musia byť čistejšie. Odporúča sa použitie neoznačkovaných testovacích látok so známym chemickým zložením a podľa možnosti aspoň 99 % čistoty alebo rádiooznačených testovaných látok so známym chemickým zložením a rádiochemickej čistoty. V prípade krátkeho polčasu rozpadu by sa mali aplikovať korekcie na rozpad. V prípade rádiooznačených testovaných látok by sa mala použiť analytická metóda pre konkrétnu chemikáliu, aby sa zabezpečilo, že meraná rádioaktivita priamo súvisí s testovanou látkou.

15. Odhad log P_{ow} je možné urobiť pomocou komerčne dostupného softvéru na odhadovanie log P_{ow} alebo pomocou pomeru rozpustností v oboch roztokoch.

16. Pred začatím pokusu s pomalým miešaním na stanovenie P_{ow} musia byť k dispozícii tieto informácie o testovanej látke:

a) štruktúrny vzorec;

b) vhodné analytické metódy na stanovenie koncentrácie látky vo vode a 1-oktanole;

c) disociačná konštanta/disociačné konštanty ionizovateľných látok [usmernenie OECD 112 (9)];

d) rozpustnosť vo vode (10);

e) abiotická hydrolýza (11);

f) ľahká biodegradovateľnosť (12);

g) tlak pary (13).

OPIS METÓDY

Zariadenie a prístroje

17. Vyžaduje sa štandardné laboratórne zariadenie, najmä:

— magnetické miešadlá a magnetické miešacie tyčinky pokryté teflónom sa používajú na miešanie vo vodnej fáze,

— analytické prístroje vhodné na stanovenie koncentrácie testovanej látky pri predpokladaných koncentráciách,

— miešacia nádoba s kohútikom na dne. V závislosti od odhadu log P_{ow} a detekčného limitu (LOD) testovanej zlúčeniny je potrebné zvážiť použitie reakčnej nádoby rovnakých geometrických tvarov s objemom vyšším ako jeden liter, aby bolo možné získať dostatočný objem vody na chemickú extrakciu a analýzu. To bude mať za následok vyššie koncentrácie vo vodnom extrakte, a teda spoľahlivejšie analytické stanovenie. Tabuľka s odhadmi minimálneho potrebného objemu, detekčným limitom zlúčeniny, odhadovaným log P_{ow} a rozpustnosťou zlúčeniny vo vode je uvedená v dodatku 1. Tabuľka vychádza zo vzťahu medzi log P_{ow} a pomerom medzi rozpustnosťou v oktanole a vo vode, ako uvádza Pinsuwan a kolektív (14):

$$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,41$$

▼M4

kde

$SR = S_{oct}/S_w$ (v molarite),

a vzťah podľa Lymana (15) na predpovedanie rozpustnosti vo vode. Rozpustnosť vo vode vypočítaná pomocou rovnice uvedenej v dodatku 1 sa považuje za prvý odhad. Treba poznamenať, že používateľ môže odhadnúť rozpustnosť vo vode na základe akéhokoľvek vzťahu, ktorý sa považuje za lepšie znázornenie vzťahu medzi hydrofobicitou a rozpustnosťou. V prípade tuhých zlúčenín sa napríklad odporúča zahrnutie bodu topenia do predpovede rozpustnosti. V prípade použitia upravenej rovnice sa treba uistiť, že rovnica na výpočet rozpustnosti v oktanole je stále platná. Schematické znázornenie miešacej nádoby so skleným plášťom s objemom približne jeden liter je uvedené v dodatku 2. Rozmery nádoby znázornenej v dodatku 2 sa ukázali byť vhodné a v prípade, že sa použije zariadenie inej veľkosti, by mali ostať zachované,

— prostriedky na udržanie konštantnej teploty počas pokusu s pomalým miešaním sú nevyhnutné.

18. Nádoby by mali byť vyrobené z inertného materiálu, aby bola adsorpcia na povrchu nádoby zanedbateľná.

Príprava testovacích roztokov

19. P_{ow} by sa mal stanoviť s využitím 1-oktanolu najvyššej čistoty, ktorý je komerčne dostupný (aspoň + 99 %). Odporúča sa purifikácia 1-oktanolu extrakciou pomocou kyseliny, bázy a vody a následné vysušenie. Okrem toho možno na purifikáciu 1-oktanolu použiť destiláciu. Purifikovaný 1-oktanol sa použije na prípravu štandardných roztokov testovaných látok. Voda, ktorá sa použije na stanovenie P_{ow}, by mala byť destilovaná zo skla alebo kremeňa, alebo získaná zo zariadenia na purifikáciu vody. Takisto je možné použiť vodu HPLC kvality. V prípade destilovanej vody sa vyžaduje filtrácia cez 0,22 μm filter. Mali by sa vykonať aj slepé pokusy na kontrolu, či sa v koncentrovaných extraktoch nenachádzajú žiadne prímesi, ktoré by mohli prísť do styku s testovanou látkou. Ak sa použije filter zo skleného vlákna, musí sa vyčistiť vypálením aspoň počas troch hodín pri teplote 400 °C.

20. Obe rozpúšťadlá sa pred pokusom navzájom nasýtia vyvažovaním v dostatočnej veľkej nádobe. Rovnováha sa dosiahne pomalým miešaním dvojfázového systému počas dvoch dní.

21. Zvolí sa vhodná koncentrácia testovanej látky, ktorá sa rozpustí v 1-oktanole (nasýtenom vodou). Rozdeľovací koeficient 1-oktanol/voda sa musí stanoviť v zriedených roztokoch v 1-oktanole a vode. Koncentrácia testovanej látky by preto v žiadnej fáze nemala presiahnuť 70 % svojej rozpustnosti s maximálnou koncentráciou 0,1 M (1). Roztoky 1-oktanolu použité pri pokuse nesmú obsahovať suspendovanú tuhú testovanú látku.

22. Vhodné množstvo testovanej látky sa rozpustí v 1-oktanole (nasýtenom vodou). Ak je odhad log P_{ow} vyšší ako päť, treba dbať na to, aby roztoky 1-oktanolu použité pri pokuse neobsahovali suspendovanú tuhú testovanú látku. Na tento účel sa v prípade chemikálií s odhadovanou hodnotou log $P_{ow} > 5$ postupuje takto:

— testovaná látka sa rozpustí v 1-oktanole (nasýtenom vodou),

▼M4

— roztoku sa poskytne dostatočný čas, aby sa suspendovaná tuhá látka usadila. Počas usádzania sa sleduje koncentrácia testovanej látky,

— potom, ako merané koncentrácie v roztoku 1-oktanolu dosiahnu stabilné hodnoty, sa zásobný roztok zriedi vhodným objemom 1-oktanolu,

— odmeria sa koncentrácia zriedeného zásobného roztoku. Ak nameraná koncentrácia zodpovedá zriedeniu, zriedený zásobný roztok možno použiť pri pokuse s pomalým miešaním.

Extrakcia a analýza vzoriek

23. Na skúšku testovanej látky sa použije platná analytická metóda. Výskumníci musia predložiť dôkazy o tom, že koncentrácie v 1-oktanole nasýtenom vodou, ako aj vo fáze vody nasýtenej 1-oktanolom počas pokusu sú vyššie ako kvantifikačný limit metódy použitých analytických postupov. Analytická výťažnosť testovanej látky z vodnej fázy a z 1-oktanolovej fázy sa musí stanoviť pred pokusom v tých prípadoch, v ktorých sú potrebné metódy extrakcie. Analytický signál musí byť korigovaný vzhľadom na slepé pokusy a treba dbať na to, aby nedošlo k prenosu analytu z jednej vzorky do druhej.

24. Pred analýzou bude pravdepodobne potrebná extrakcia vodnej fázy pomocou organického rozpúšťadla a prekoncentrácia extraktu z dôvodu pomerne nízkych koncentrácií hydrofóbnych testovaných látok vo vodnej fáze. Z toho istého dôvodu je nevyhnutné znížiť koncentrácie pri prípadných slepých pokusoch. Na tento účel treba použiť rozpúšťadlá vysokej čistoty, podľa možnosti rozpúšťadlá na analýzu rezíduí. Takisto práca s vopred dôkladne vyčisteným sklom (napr. umývanie rozpúšťadlom alebo vypaľovanie pri zvýšenej teplote) môže pomôcť zabrániť krížovej kontaminácii.

25. Odhad log P_{ow} možno získať z programu na odhadovanie alebo z odborného posudku. Ak je hodnota vyššia ako šesť, potom je potrebné dôkladne sledovať korekcie vzhľadom na slepé pokusy a prenos analytu. Podobne ak je odhad log P_{ow} vyšší ako šesť, je potrebné použiť náhradný štandard na korekciu výťažnosti, aby bolo možné dosiahnuť vysoké prekoncentračné faktory. Na odhadovanie log P_{ow} je k dispozícii množstvo komerčne dostupných softvérových programov ([1]), napr. Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) a ACD log P (19). Opisy postupov odhadovania sú uvedené v odkazoch (20 – 22).

26. Kvantifikačné limity (LOQ) na určenie testovanej látky v 1-oktanole a vo vode sa stanovia pomocou akceptovaných metód. Podľa štandardného pravidla možno kvantifikačný limit metódy stanoviť ako koncentráciu vo vode alebo v 1-oktanole, ktorej pomer signálu k šumu má hodnotu desať. Treba zvoliť vhodné metódy extrakcie a prekoncentrácie a takisto treba špecifikovať analytickú výťažnosť. Po analytickom stanovení sa vyberie vhodný prekoncentračný faktor s cieľom získať signál požadovanej veľkosti.

([1]) Táto informácia sa uvádza iba s cieľom pomôcť používateľom. Možno použiť iné rovnocenné počítačové programy, ak je možné preukázať, že sa nimi dosahujú rovnaké výsledky.

▼M4

27. Na základe parametrov analytickej metódy a predpokladaných koncentrácií sa určí približná veľkosť vzorky potrebná na presné stanovenie koncentrácie zlúčeniny. Treba sa vyhnúť používaniu vzoriek vody, ktoré sú príliš malé na získanie dostatočného analytického signálu. Takisto sa treba vyhnúť používaniu nadmerne veľkých vzoriek vody, lebo inak sa môže stať, že na minimálny požadovaný počet analýz (n = 5) ostane príliš málo vody. V dodatku 1 je minimálny objem vzorky uvedený ako funkcia objemu nádoby, LOD testovanej látky a rozpustnosti testovanej látky.

28. Kvantifikácia testovanej látky sa vykonáva porovnaním s kalibračnými krivkami príslušnej zlúčeniny. Koncentrácie v analyzovaných vzorkách musia byť ohraničené koncentráciami štandardov.

29. V prípade testovaných látok s odhadovaným log P_{ow} vyšším ako šesť treba náhradný štandard pridať do vzorky vody pred extrakciou s cieľom zaregistrovať straty, ku ktorým došlo v priebehu extrakcie a prekoncentrácie vzoriek vody. S cieľom zabezpečiť presnú korekciu výťažnosti musia mať náhradné látky vlastnosti, ktoré sú veľmi podobné alebo totožné s vlastnosťami testovanej látky. Na tento účel sa uprednostňuje použitie (stabilných) izotopicky označených analógov k skúmaným látkam (napríklad perdeuterovaných alebo označených uhlíkom ^{13}C). Ak nie je možné použiť označené stabilné izotopy, t. j. ^{13}C alebo ^{2}H, treba na základe spoľahlivých údajov z literatúry preukázať, že fyzikálno-chemické vlastnosti náhradnej látky sú veľmi podobné fyzikálno-chemickým vlastnostiam testovanej látky. V priebehu extrakcie kvapaliny kvapalinou vo vodnej fáze môže dôjsť k tvorbe emulzií. Možno ich redukovať pridaním soli a umožnením, aby sa emulzia počas noci usadila. Metódy používané na extrahovanie a prekoncentráciu vzoriek treba uviesť do správy.

30. Vzorky získané z 1-oktanolovej fázy možno pred analýzou v prípade potreby zriediť vhodným rozpúšťadlom. Okrem toho sa použitie náhradných štandardov na korekciu výťažnosti odporúča v prípade látok, pri ktorých pokusy s výťažnosťou preukázali vysoký stupeň variácie (relatívna smerodajná odchýlka > 10 %).

31. Podrobné informácie o analytickej metóde sa musia uviesť v správe. Tieto informácie zahŕňajú metódu extrakcie, prekoncentračné a zrieďovacie faktory, parametre prístrojov, postup kalibrácie, rozsah kalibrácie, analytickú výťažnosť testovanej látky z vody, pridanie náhradných štandardov na korekciu výťažnosti, hodnoty slepých pokusov, detekčné limity a kvantifikačné limity.

Realizácia testu

Optimálne pomery objemov 1-oktanol/voda

32. Pri voľbe objemov vody a 1-oktanolu by sa mali zohľadniť LOQ v 1-oktanole a vo vode, prekoncentračné faktory použité pri vzorkách vody, objemy vzoriek 1-oktanolu a vody a predpokladané koncentrácie. Z experimentálnych dôvodov by sa mal objem 1-oktanolu v systéme pomalého miešania zvoliť tak, aby vrstva 1-oktanolu bola dostatočne hrubá (> 0,5 cm) a umožňovala odber vzoriek počas 1-oktanolovej fázy bez jej narušenia.

33. Bežné fázové pomery používané na stanovenie zlúčenín s log P_{ow} rovnajúcim sa 4,5 alebo vyšším sú 20 – 50 ml 1-oktanolu a 950 – 980 ml vody v litrovej nádobe.

▼M4

Podmienky testovania

34. V priebehu testu sa reakčná nádoba tepelne stabilizuje, aby teplota nekolísala o viac ako 1 °C. Skúška sa vykonáva pri teplote 25 °C.

35. Pokusný systém by mal byť chránený pred denným svetlom buď tak, že sa pokus vykoná v tmavej miestnosti, alebo tak, že sa reakčná nádoba prikryje hliníkovou fóliou.

36. Pokus by sa mal vykonať v bezprašnom prostredí (pokiaľ je to možné).

37. Systém 1-oktanol-voda sa mieša, až kým sa nedosiahne rovnováha. Pri pilotnom pokuse sa posúdi dĺžka obdobia vyvažovania vykonaním pokusu s pomalým miešaním a pravidelným odberom vzorky vody a 1-oktanolu. Medzi jednotlivými odbermi vzoriek by malo uplynúť minimálne päť hodín.

38. Pri každom stanovení P_{ow} treba vykonať najmenej tri nezávislé pokusy s pomalým miešaním.

Stanovenie času dosiahnutia rovnováhy

39. Predpokladá sa, že rovnováha sa dosiahne, keď regresná funkcia pomeru koncentrácie 1-oktanol/voda v závislosti od času v priebehu štyroch časových bodov dosiahne sklon, ktorý sa pri hladine významnosti alfa 0,05 výrazne nelíši od nulového sklonu. Minimálny čas dosiahnutia rovnováhy je jeden deň pred začatím odberov vzoriek. Podľa štandardného pravidla sa môžu vzorky látok s odhadovaným log P_{ow} nižším ako päť odoberať počas druhého a tretieho dňa. Môže sa stať, že vyvažovanie sa bude musieť v prípade hydrofóbnych zlúčenín predĺžiť. V prípade zlúčeniny s log P_{ow} 8,23 (dekachlórbifenyl) stačilo na dosiahnutie rovnováhy 144 hodín. Rovnováha sa posudzuje prostredníctvom opakovaného odberu z jednej nádoby.

Začiatok pokusu

40. Na začiatku pokusu sa reakčná nádoba naplní vodou nasýtenou 1-oktanolom. Na dosiahnutie stálej teploty by mal byť k dispozícii dostatok času.

41. Do reakčnej nádoby sa opatrne pridá želané množstvo testovanej látky (rozpustené v požadovanom objeme 1-oktanolu nasýtenom vodou). Tento krok je v rámci pokusu veľmi dôležitý, lebo je potrebné vyhnúť sa prudkému miešaniu dvoch fáz. Na tento účel možno 1-oktanolovú fázu pomaly pipetou preniesť na stenu testovacej nádoby blízko hladiny vody. Tá následne stečie po sklenej stene a vytvorí nad vodnou fázou film. Vždy treba zabrániť tomu, aby 1-oktanol stekal priamo do banky. Kvapky 1-oktanolu by nemali padať priamo do vody.

42. Po začatí miešania sa rýchlosť miešania pomaly zvyšuje. Ak miešacie motory nemožno vhodne nastaviť, treba uvažovať nad použitím transformátora. Rýchlosť miešania sa nastaví tak, aby sa na rozhraní medzi vodou a 1-oktanolom vytvoril vír s hĺbkou od 0,5 cm do maximálne 2,5 cm. Rýchlosť miešania by sa mala znížiť, ak hĺbka víru presiahne 2,5 cm. V opačnom prípade sa z kvapôčok 1-oktanolu vo vodnej fáze môžu vytvoriť mikrokvapôčky, čo bude mať za následok nadhodnotenie koncentrácie testovanej látky vo vode. Maximálna rýchlosť miešania pri hĺbke 2,5 cm je odporúčaná na základe zistení potvrdzujúcej štúdie kruhového testu (5). Ide o kompromis medzi rýchlym dosiahnutím rovnováhy a zamedzením tvorbe 1-oktanolových mikrokvapôčok.

▼**M4**

Odber a spracovanie vzoriek

43. Miešadlo sa pred odobratím vzoriek vypne a počká sa, kým pohyb kvapalín neustane. Po dokončení odberu vzorky sa miešadlo opäť pomaly spustí, ako je opísané vyššie, a následne sa rýchlosť miešania bude postupne zvyšovať.

44. Pri vodnej fáze sa vzorka odoberie z uzatváracieho kohútika na dne reakčnej nádoby. Vždy je potrebné odstrániť mŕtvy objem vody v kohútikoch (približne 5 ml v prípade nádoby znázornenej v dodatku 2). Voda v kohútikoch sa nemieša, a preto nie je v rovnováhe s hlavným objemom. Zaznamenajte objem vzoriek vody a uistite sa, že množstvo testovanej látky prítomnej v odstránenej vode sa zohľadní pri nastavovaní hmotnostnej bilancie. Straty vznikajúce pri odparovaní by sa mali minimalizovať, a to tak, že sa umožní, aby voda pokojne stiekla do oddeľovacieho lievika, čím sa zabráni narušeniu vrstvy voda/1-oktanol.

45. Vzorky 1-oktanolu sa získajú odobratím malej alikvotnej časti (cca. 100 µl) z vrstvy 1-oktanolu 100-mikrolitrovou skleneno-kovovou striekačkou. Treba dbať na to, aby sa nenarušila hranica. Objem odobratej vzorky kvapaliny sa zaznamená. Malá alikvotná časť je postačujúca, lebo vzorka 1-oktanolu sa zriedi.

46. Treba sa vyhnúť zbytočným prenosom vzorky. Na tento účel by sa objem vzorky mal stanoviť gravimetricky. V prípade vzoriek vody to možno dosiahnuť sústredením vzorky vody v oddeľovacom lieviku, ktorý už obsahuje požadovaný objem rozpúšťadla.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

47. Podľa tejto testovacej metódy sa P_{ow} stanoví vykonaním troch pokusov s pomalým miešaním (tri pokusné jednotky) so skúmanou zlúčeninou pri totožných podmienkach. Regresia použitá na preukázanie dosiahnutia rovnováhy by mala vychádzať z výsledkov aspoň štyroch stanovení C_O/C_W v po sebe nasledujúcich časových bodoch. Tým sa umožní výpočet rozptylu ako ukazovateľa neistoty priemernej hodnoty získanej v prípade každej pokusnej jednotky.

48. P_{ow} je možné charakterizovať rozptylom údajov získaných pre každú pokusnú jednotku. Tieto informácie sa použijú na výpočet P_{ow} ako váženého priemeru výsledkov jednotlivých pokusných jednotiek. Na tento účel sa ako váha použije inverzná funkcia rozptylu výsledkov získaných z pokusných jednotiek. V dôsledku toho majú údaje s vysokou variáciou (vyjadrenou ako rozptyl), a teda nižšou spoľahlivosťou menší vplyv na výsledok ako údaje s nízkym rozptylom.

49. Analogicky sa vypočíta vážená smerodajná odchýlka. Tá vyjadruje opakovateľnosť merania P_{ow}. Nízka hodnota váženej smerodajnej odchýlky znamená, že stanovenie P_{ow} malo v rámci jedného laboratória vysokú opakovateľnosť. Formálne štatistické spracovanie údajov je vysvetlené ďalej.

▼M4

Spracovanie výsledkov

Preukázanie dosiahnutia rovnováhy

50. Logaritmus pomeru koncentrácie testovanej látky v 1-oktanole a vo vode [log (C_O/C_w)] sa vypočíta pri každom odbere vzorky. Dosiahnutie chemickej rovnováhy sa preukáže jej grafickým znázornením ako funkcie času. Horná hranica (plató) na tomto znázornení, ktoré je založené aspoň na štyroch po sebe nasledujúcich časových bodoch, ukazuje, že rovnováha bola dosiahnutá a že zlúčenina sa v 1-oktanole naozaj rozpustila. Ak to tak nie je, test musí pokračovať, až kým funkcia v priebehu štyroch po sebe nasledujúcich časových bodov nedosiahne sklon, ktorý sa pri hladine významnosti alfa 0,05 výrazne nelíši od nulového sklonu, čo znamená, že log C_o/C_w nie je závislý od času.

Log P_{ow} – výpočet

51. Hodnota log P_{ow} pokusnej jednotky sa vypočíta ako vážená priemerná hodnota log C_o/C_w tej časti krivky log C_o/C_w ako funkcie času, v ktorej sa preukázala rovnováha. Vážený priemer sa vypočíta vážením údajov inverznou funkciou rozptylu, aby bol vplyv údajov na konečný výsledok nepriamo úmerný neistote údajov.

Priemerný log P_{ow}

52. Priemerná hodnota log P_{ow} rôznych pokusných jednotiek sa vypočíta ako priemer výsledkov jednotlivých pokusných jednotiek vážený ich zodpovedajúcim rozptylom.

Výpočet je takýto:

$$\log P_{OW,Av} = (\Sigma w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\Sigma w_i)^{-1}$$

kde

$\log P_{ow,i}$ = hodnota log P_{ow} individuálnej pokusnej jednotky i,

$\log P_{ow,Av}$ = vážená priemerná hodnota individuálnych stanovení log P_{ow},

w_i = štatistická váha pripísaná hodnote log P_{ow} pokusnej jednotky i.

Recipročná hodnota rozptylu log $P_{ow,i}$ sa použije ako $w_i[w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}]$.

53. Chyba priemeru log P_{ow} sa odhadne ako opakovateľnosť log C_o/C_w stanovená počas fázy rovnováhy pri jednotlivých pokusných jednotkách. Je vyjadrená ako vážená smerodajná odchýlka log $P_{ow,Av}$ ($\sigma_{\log Pow,Av}$), ktorá je zasa ukazovateľom chyby súvisiacej s log $P_{ow,Av}$. Váženú smerodajnú odchýlku možno vypočítať z váženého rozptylu ($\text{var}_{\log Pow,Av}$) takto:

$$\text{var}_{\log Pow,Av} = (\Sigma w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\Sigma w_i \times (n-1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log Pow,Av} = (\text{var}_{\log Pow,Av})^{0,5}$$

Premenná n predstavuje počet pokusných jednotiek.

▼M4

Správa o teste

54. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

— bežný názov, chemický názov, číslo CAS, štruktúrny vzorec, (s vyznačením polôh značkovania, ak sa používa značkovanie rádioaktívnym izotopom) a príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti (pozri odsek 17),

— čistota (nečistoty) testovanej látky,

— čistota značky chemických látok značených rádioaktívnym izotopom a molárna aktivita (ak je to vhodné),

— predbežný odhad log P_{ow}, ako aj metóda použitá na odvodenie hodnoty.

Podmienky testovania:

— dátumy vykonávania štúdií,

— teplota počas pokusu,

— objem 1-oktanolu a vody na začiatku testu,

— objem odobratých vzoriek 1-oktanolu a vody,

— objem 1-oktanolu a vody, ktorý ostal v testovacích nádobách,

— opis použitých testovacích nádob a podmienok miešania (geometria miešacej tyčinky a testovacej nádoby, výška pri vortexovaní v mm a v prípade dostupnosti: rýchlosť miešania),

— použité analytické metódy na určenie testovanej látky a kvantifikačný limit metódy,

— časy odberu vzoriek,

— použité pH vodnej fázy a pufrovania, pričom pH je upravené pre ionizovateľné molekuly,

— počet paraleliek.

Výsledky:

— opakovateľnosť a citlivosť použitých analytických metód,

— určené koncentrácie testovanej látky v 1-oktanole a vode ako funkcia času,

— demonštrácia hmotnostnej bilancie,

— teplota a smerodajná odchýlka alebo rozsah teploty počas pokusu,

— regresia koncentračného pomeru v čase,

— priemerná hodnota log $P_{ow,Av}$ a jej štandardná chyba,

— rozbor a výklad výsledkov,

▼M4

— príklady nespracovaných údajov reprezentatívnej vzorky (všetky nespracované údaje musia byť uložené v súlade so štandardmi dobrej laboratórnej praxe) vrátane výťažnosti náhradných látok a počtu úrovní použitých pri kalibrácií (spolu s kritériami korelačného koeficientu kalibračnej krivky) a výsledkov zabezpečenia kvality a kontroly kvality (QA/QC),

— v prípade dostupnosti: potvrdzujúca správa o postupe skúšky (ktorá sa uvedie v odkazoch).

LITERATÚRA

1. De Bruijn, J. H. M., Busser, F., Seinen, W., Hermens, J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the „slow-stirring“ method. Environ. Toxicol. Chem. 8: 499 – 512.

2. Kapitola A.8 tejto prílohy, Rozdeľovací koeficient.

3. Kapitola A.8 tejto prílohy, Rozdeľovací koeficient.

4. OECD (2000). OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Paríž.

5. Tolls, J. (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.

6. Boethling, R. S., Mackay, D. (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.

7. Schwarzenbach, R. P., Gschwend, P. M., Imboden, D. M. (1993). Environmental Organic Chemistry. Wiley, New York, NY.

8. Arnold, C. G., Widenhaupt, A., David, M. M., Müller, S. R., Haderlein, S. B., Schwarzenbach, R. P. (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol*. 31: 2 596 – 2 602.

9. OECD (1981) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water. Paríž.

10. Kapitola A.6 tejto prílohy, Rozpustnosť vo vode.

11. Kapitola C.7 tejto prílohy, Degradácia – Abiotická degradácia: hydrolýza ako funkcia pH.

12. Kapitola C.4 – časť II – VII (metóda A až F) tejto prílohy, Stanovenie „ľahkej“ biodegradovateľnosti.

13. Kapitola A.4 tejto prílohy, Tlak pary.

14. Pinsuwan, S., Li A., a Yalkowsky, S. H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623 – 626.

15. Lyman, W. J. (1990). Solubility in water. In: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman, W. J., Reehl, W. F., Rosenblatt, D. H., Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2-1 až 2-52.

16. Leo, A., Weininger, D. (1989). Medchem Software Manual. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.

17. Meylan, W. (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.

18. Compudrug, L. (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budapešť.

19. ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.

▼**M4**

20. Lyman, W. J. (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman, W. J., Reehl, W. F., Rosenblatt, D. H., eds, *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.

21. Rekker, R. F., de Kort, H. M. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther*. 14: 479 – 488.

22. Jübermann, O. (1958). Houben-Weyl, ed, *Methoden der Organischen Chemie*: 386 – 390.

▼M4

Dodatok 1

Tabuľka na výpočet minimálnych objemov vody požadovaných na zistenie testovaných látok s rôznymi hodnotami log P_{ow} vo vodnej fáze

Predpoklady:

— Maximálny objem jednotlivých alikvotných častí = 10 % celkového objemu, 5 alikvotných častí = 50 % celkového objemu.

— Koncentrácia testovaných látok = $0,7 \times$ rozpustnost vkaždej fáze. V prípade nižších koncentrácií sa vyžadujú väčšie objemy.

— Objem použitý na stanovenie detekčného limitu (LOD) = 100 ml.

— log P_{ow} oproti log S_w a log P_{ow} oproti SR (S_{oct}/S_w) primerane reprezentujú vzťahy testovaných látok.

Odhad S_w

log P_{ow}	Rovnica	log S_w	S_w (mg/l)
4	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	0,496	3,133E+00
4,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	0,035	1,084E+00
5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	–0,426	3,750E–01
5,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	–0,887	1,297E–01
6	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	–1,348	4,487E–02
6,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	–1,809	1,552E–02
7	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	–2,270	5,370E–03
7,5	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	–2,731	1,858E–03
8	$(-)0,922 \times \log P_{ow} + 4,184$	–3,192	6,427E–04

Odhad S_{oct}

log P_{ow}	Rovnica	S_{oct} (mg/l)
4	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,41$	3,763E+04
4,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,42$	4,816E+04
5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,43$	6,165E+04
5,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,44$	7,890E+04
6	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,45$	1,010E+05
6,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,46$	1,293E+05
7	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,47$	1,654E+05
7,5	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,48$	2,117E+05
8	$\log P_{ow} = 0,88\log SR + 0,49$	2,710E+05

▼**M4**

Celková hmotnosť testovanej látky (mg)	$Hmotnosť_{okt}$/ $hmotnosť_{voda}$	$Hmotnosť_{H2O}$ (mg)	$Koncentrácia_{H2O}$ (mg/l)	$Hmotnosť_{okt}$ (mg)	$Koncentrácia_{okt}$ (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333
1 686	1 664	1,0127	1,0660	1 685	33 709
2 158	5 263	0,4099	0,4315	2 157	43 149
2 762	16 644	0,1659	0,1747	2 762	55 230
3 535	52 632	0,0672	0,0707	3 535	70 691
4 524	1664 36	0,0272	0,0286	4 524	90 480
5 790	5263 16	0,0110	0,0116	5 790	115 807
7 411	1 664 357	0,0045	0,0047	7 411	148 223
9 486	5 263 158	0,0018	0,0019	9 486	189 713

Výpočet objemov

Minimálny objem požadovaný pre fázu H_2O pri každej koncentrácii

$\log K_{ow}$	LOD (mikrogramy/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
Objem použitý pri LOD l)	0,1					

Kľúč pre výpočty

Predstavuje < 10 % celkového objemu vodnej fázy, jednolitrová nádoba na ustálenie rovnováhy.

Predstavuje < 10 % celkového objemu vodnej fázy, dvojlitrová nádoba na ustálenie rovnováhy.

Predstavuje < 10 % celkového objemu vodnej fázy, päťlitrová nádoba na ustálenie rovnováhy.

Predstavuje < 10 % celkového objemu vodnej fázy, desaťlitrová nádoba na ustálenie rovnováhy.

Presahuje 10 % aj v prípade desaťlitrovej nádoby na ustálenie rovnováhy.

▼M4

Prehľad požadovaných objemov ako funkcia rozpustnosti vo vode a log P_{ow}

Minimálny objem požadovaný pre fázu H_2O pri každej koncentrácii LOD (ml)

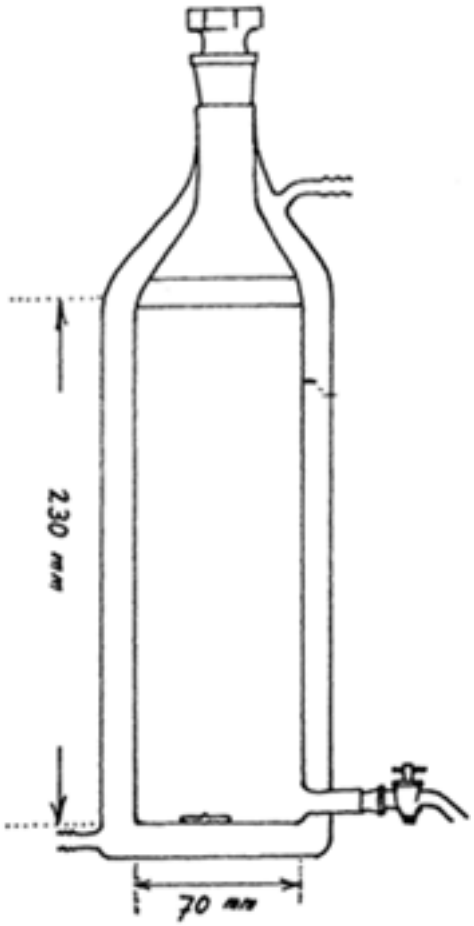
log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (mikrogramy/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32

▼M4

log P_{ow}	S_w (mg/l)	LOD (mikrogramy/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Objem použitý pre LOD l)		0,1					

Dodatok 2

Príklad testovacej nádoby so skleným plášťom pre pokus s pomalým miešaním na stanovenie P_{ow}



▼B

ČASŤ B: METÓDY NA STANOVENIE TOXIKOLOGICKÝCH VLASTNOSTÍ A INÉHO ÚČINKU NA ZDRAVIE

OBSAH

VŠEOBECNÝ ÚVOD

B.1a. AKÚTNA ORÁLNA TOXICITA – METÓDA STABILNEJ DÁVKY

B.1b. AKÚTNA ORÁLNA TOXICITA – METÓDA TRIEDY AKÚTNEJ TOXICITY

B.2. AKÚTNA INHALAČNÁ TOXICITA

B.3. AKÚTNA TOXICITA (DERMÁLNA)

B.4. AKÚTNA TOXICITA: PODRÁŽDENIE/POLEPTANIE KOŽE

B.5. AKÚTNA TOXICITA: PODRÁŽDENIE/POLEPTANIE OKA

B.6. PODRÁŽDENIE POKOŽKY

B.7. 28-DŇOVÁ ŠTÚDIA ORÁLNEJ TOXICITY PRI HLODAVCOCH/TEST V OPAKOVANÝCH DÁVKACH

B.8. SUBAKÚTNA INHALAČNÁ TOXICITA: 28-DŇOVÁ ŠTÚDIA

B.9. TOXICITA PO 28-DŇOVEJ OPAKOVANEJ DÁVKE (DERMÁLNA)

B.10. MUTAGÉNNOSŤ – *IN VITRO* TEST CHROMOZÓMOVEJ ODCHÝLKY U CICAVCOV

B.11. MUTAGÉNNOSŤ – *IN VIVO* TEST CHROMOZÓMOVEJ ODCHÝLKY V KOSTNEJ DRENI CICAVCOV

B.12. MUTAGÉNNOSŤ – *IN VIVO* TEST MIKROJADRA ERYTROCYTU U CICAVCOV

B.13/14. MUTAGÉNNOSŤ: BAKTERIÁLNY TEST REVERZNÝCH MUTÁCIÍ

B.15. TESTOVANIE MUTAGÉNNOSTI A SKRÍNING KARCINOGÉNNOSTI – SKÚŠKA NA GÉNOVÚ MUTÁCIU *U SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

B.16. MITOTICKÁ REKOMBINÁCIA – *SACCHAROMYCESC CEREVISIAE*

B.17. MUTAGÉNNOSŤ – *IN VITRO* TEST MUTÁCIÍ GÉNOV BUNIEK CICAVCOV

B.18. POŠKODENIE A OPRAVA DNA – NEPROGRAMOVANÁ SYNTÉZA DNA – BUNKY CICAVCOV *IN VITRO*

B.19. TEST VÝMENY SESTERSKÝCH CHROMATÍD *IN VITRO*

B.20. TEST NA ZACHYTENIE RECESÍVNYCH LETÁLNYCH MUTÁCIÍ VIAZANÝCH NA POHLAVIE PRI *DROSOPHILA MELANOGASTER*

▼B

B.21.	TESTY BUNKOVEJ TRANSFORMÁCIE CICAVČÍCH BUNIEK *IN VITRO*
B.22.	DOMINANTNÝ LETÁLNY TEST U HLODAVCOV
B.23.	TEST SPERMATOGONÁLNEJ CHROMOZÓMOVEJ ODCHÝLKY U CICAVCOV
B.24.	SPOT TEST U MYŠÍ
B.25.	DEDIČNÁ TRANSLOKÁCIA U MYŠÍ
B.26.	TEST SUBCHRONICKEJ ORÁLNEJ TOXICITY: OPAKOVANÁ 90-DŇOVÁ ŠTÚDIA ORÁLNEJ TOXICITY U HLODAVCOV/TEST V OPAKOVANÝCH DÁVKACH/
B.27.	TEST SUBCHRONICKEJ ORÁLNEJ TOXICITY: OPAKOVANÁ 90-DŇOVÁ ŠTÚDIA ORÁLNEJ TOXICITY U NEHLODAVCOV
B.28.	ŠTÚDIA SUBCHRONICKEJ DERMÁLNEJ TOXICITY PO 90-DŇOVEJ OPAKOVANEJ KOŽNEJ APLIKÁCII U HLODAVCOV
B.29.	SUBCHRONICKÁ INHALAČNÁ TOXICITA: 90-DŇOVÁ ŠTÚDIA
B.30.	ŠTÚDIE CHRONICKEJ TOXICITY
B.31.	ŠTÚDIA PRENATÁLNEJ VÝVOJOVEJ TOXICITY
B.32.	ŠTÚDIE KARCINOGENITY
B.33.	KOMBINOVANÁ ŠTÚDIA CHRONICKEJ TOXICITY/KARCINOGENITY
B.34.	JEDNOGENERAČNÝ REPRODUKČNÝ TEST TOXICITY
B.35.	DVOJGENERAČNÁ ŠTÚDIA REPRODUKČNEJ TOXICITY
B.36.	TOXIKOKINETIKA
B.37.	ONESKORENÁ NEUROTOXICITA ORGANOFOSFOROVÝCH LÁTOK PO AKÚTNEJ EXPOZÍCII ICH ÚČINKOM
B.38.	ONESKORENÁ NEUROTOXICITA ORGANOFOSFOROVÝCH LÁTOK PRI 28-DŇOVEJ ŠTÚDII OPAKOVANEJ DÁVKY
B.39.	TEST NEPLÁNOVANEJ SYNTÉZY DNA (UNSCHEDULED DNA SYNTHESIS – UDS) S PEČEŇOVÝMI BUNKAMI CICAVCOV *IN VIVO*
B.40.	POLEPTANIE KOŽE *IN VITRO:* TEST POMOCOU TRANSKUTÁNNEHO ELEKTRICKÉHO ODPORU (TER)
B.40a.	POLEPTANIE KOŽE *IN VITRO:* TEST POMOCOU MODELU ĽUDSKEJ KOŽE

▼**B**

B.41.	TEST FOTOTOXICITY 3T3 NRU *IN VITRO*
B.42.	SENZIBILIZÁCIA KOŽE: LOKÁLNA SKÚŠKA LYMFATICKÝCH UZLÍN
B.43.	ŠTÚDIA NEUROTOXICITY U HLODAVCOV
B.44.	ABSORPCIA KOŽOU: METÓDA *IN VIVO*
B.45.	ABSORPCIA KOŽOU: METÓDA *IN VITRO*
B.46.	PODRÁŽDENIE KOŽE IN VITRO: TEST NA MODELI REKONŠTRUOVANEJ ĽUDSKEJ POKOŽKY
B.47.	TESTOVACIA METÓDA ZÁKALU A PRIEPUSTNOSTI HOVÄDZEJ ROHOVKY NA ZISŤOVANIE OČNÝCH ŽIERAVÍN A SILNE DRÁŽDIVÝCH LÁTOK
B.48.	TESTOVACIA METÓDA IZOLOVANÉHO KURACIEHO OKA NA ZISŤOVANIE OČNÝCH ŽIERAVÍN A SILNE DRÁŽDIVÝCH LÁTOK
B.49.	*IN VITRO* TEST MIKROJADIER BUNIEK CICAVCOV
B.50.	SENZIBILIZÁCIA KOŽE: LOKÁLNA SKÚŠKA LYMFATICKÝCH UZLÍN: DA
B.51.	SENZIBILIZÁCIA KOŽE: LOKÁLNA SKÚŠKA LYMFATICKÝCH UZLÍN: BRDU-ELISA

▼**M4**

B.52.	AKÚTNA INHALAČNÁ TOXICITA – METÓDA AKÚTNEJ TOXICKEJ TRIEDY

▼B

VŠEOBECNÝ ÚVOD

A. KLASIFIKÁCIA TESTOVANEJ LÁTKY

Pred začatím toxikologickej štúdie musí byť známe zloženie testovanej látky, hlavné nečistoty a podstatné fyzikálno-chemické vlastnosti vrátane jej stability.

Fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej látky poskytujú dôležité informácie pri výbere spôsobu použitia, plánovaní každého detailu štúdie a pri manipulácii s testovanou látkou a pri jej skladovaní.

Začatiu štúdie musí predchádzať vývoj analytickej metódy pre kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie testovanej látky (vrátane hlavných nečistôt, ak je možné) v testovanom a biologickom materiáli.

V správe z testu musia byť uvedené všetky informácie týkajúce sa identifikácie, fyzikálno-chemických vlastností, čistoty a správania testovanej látky.

B. STAROSTLIVOSŤ O ZVIERATÁ

Pri toxikologickom testovaní je dôležitá prísna kontrola životných podmienok a vhodnej starostlivosti o zvieratá.

i) *Podmienky bývania*

Životné podmienky v experimentálnych zverincoch alebo ohradách musia byť vhodné pre testovaný druh. Pre potkany, myši a morčatá je vhodná teplota miestnosti 22 °C ± 3 °C s relatívnou vlhkosťou od 30 % do 70 %. Pre králiky je to teplota 20 °C ± 3 °C s relatívnou vlhkosťou od 30 % do 70 %.

Niektoré experimentálne postupy sú najmä citlivé na teplotu a v týchto prípadoch bývajú podrobnosti uvedené v opise metódy testovania. Pri všetkých sledovaniach toxických účinkov sa sleduje tiež teplota a vlhkosť, zaznamenáva sa a uvádza sa v záverečnej správe štúdie.

Osvetlenie má byť umelé v intervaloch 12 hodín svetlo, 12 hodín tma. Detaily o vlastnostiach osvetlenia sa zaznamenávajú a uvádzajú v záverečnej správe štúdie.

Zvieratá sa držia jednotlivo alebo sú umiestnené v klietkach v malých skupinách toho istého pohlavia, iba ak je to v metóde uvedené; v jednej klietke nesmie byť umiestnených viac ako päť zvierat.

V správe k pokusom so zvieratami sa uvádza spôsob ich umiestnenia v klietkach, počet zvierat v každej klietke aj počas expozície chemikáliou aj počas nasledujúceho obdobia pozorovania.

▼B

ii) *Podmienky kŕmenia*

Strava musí vyhovovať výživovým požiadavkám testovaného druhu. Ak sa testované látky podávajú zvieratám v strave, môžu sa nutričné hodnoty znížiť interakciou medzi látkou a zložkami potravy. Pri interpretácii výsledkov testu sa musí vziať do úvahy možnosť takýchto reakcií. Bežná laboratórna strava sa podáva s neobmedzeným prídelom pitnej vody. Výber potravy môže byť ovplyvnený potrebou zaistenia vhodného prídavku testovanej látky pri použití danej metódy.

Kontaminanty potravy, o ktorých je známe, že vplývajú na toxicitu, nesmú byť prítomné v koncentráciách, ktoré by rušili testovanie.

C. **ALTERNATÍVNE TESTOVANIE**

Európska únia sa zaviazala podporiť vývoj a hodnotenie alternatívnych postupov, ktoré poskytnú takú istú úroveň informácií ako súčasné štúdie na zvieratách, ale ktoré používajú menej zvierat, spôsobujú menej utrpenia alebo sa vyhýbajú ich použitiu úplne.

Tieto metódy, tak ako sa zavádzajú, treba brať do úvahy všade tam, kde možno uskutočniť charakterizáciu rizika a následnú klasifikáciu a opísanie vlastného rizika.

D. **VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA**

Po vyhodnotení a interpretovaní testov sa berú do úvahy obmedzenia v rozsahu, v ktorom boli výsledky štúdií na zvieratách a štúdií *in vitro* extrapolované priamo na človeka, a z toho dôvodu sa dôkaz nepriaznivého účinku na človeka, pokiaľ je prístupný, používa na potvrdenie výsledkov testovania.

E. **ODPORÚČANÁ LITERATÚRA**

Väčšina uvedených metód sa vyvíja v rámci programu OECD pre zásady testovania a uskutočňuje sa v zhode so zásadami správnej laboratórnej praxe s cieľom zaistenia „vzájomnej akceptácie údajov“ v takom rozsahu, ako je len možné.

Ďalšie informácie sa dajú získať v odkazoch uvedených v zásadách OECD a v príslušnej inde uvedenej literatúre.

▼B

B.1a. **AKÚTNA ORÁLNA TOXICITA – METÓDA STABILNEJ DÁVKY**

1. **METÓDA**

Táto testovacia metóda je rovnocenná s OECD TG 420 (2001).

1.1. ÚVOD

Tradičné metódy na hodnotenie akútnej toxicity využívajú smrť zvierat ako konečný bod. V roku 1984 Britská toxikologická spoločnosť navrhla novú koncepciu testovania akútnej toxicity založenú na podávaní série stabilných dávok (1). Koncepcia nevyužíva smrť zvierat ako konečný bod a vychádza namiesto toho z pozorovaní jasných príznakov toxicity pri jednej zo série stabilných dávok. Po validačných štúdiách *in vivo* v Spojenom kráľovstve (2) a aj v medzinárodných štúdiách *in vivo* sa tento postup prijal ako testovacia metóda v roku 1992. Následne sa štatistické vlastnosti metódy stabilnej dávky hodnotili s použitím matematických modelov v rade štúdií (4) (5) (6). Štúdie *in vivo* a modelové štúdie spolu názorne ukázali, že metóda je reprodukovateľná, používa sa pri nej menej zvierat a spôsobuje menej utrpenia ako tradičné metódy a umožňuje zatriediť látky podobne ako iné testovacie metódy akútnej toxicity.

Usmernenie pre výber najvhodnejšej testovacej metódy na daný účel možno nájsť v Usmerňujúcom dokumente o testovaní akútnej orálnej toxicity (Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing) (7). Tento usmerňujúci dokument obsahuje aj doplňujúce informácie o vykonávaní a interpretácii testovacej metódy B.1a.

Princípom tejto metódy je, že v základnej štúdii sa používajú iba mierne toxické dávky a že je potrebné vyhýbať sa podávaniu dávok, pri ktorých sa očakáva, že sú smrteľné. Nie je tiež potrebné podávať dávky, o ktorých je známe, že spôsobujú silnú bolesť a utrpenie následkom leptavých alebo silne dráždivých účinkov. Moribundné zvieratá alebo zvieratá so zrejmými bolesťami alebo vykazujúcimi známky silného a pretrvávajúceho utrpenia sa humánnym spôsobom usmrtia a pri interpretácii výsledkov testu sa vyhodnotia ako zvieratá, ktoré uhynuli pri teste. Kritériá na rozhodnutie usmrtiť moribundné alebo silne trpiace zvieratá a usmernenie o uznaní predvídateľnej alebo nastávajúcej smrti je predmetom samostatného usmerňovacieho dokumentu (8).

Metóda poskytuje informácie o nebezpečných vlastnostiach a umožňuje, aby sa látka mohla zatriediť a klasifikovať podľa Globálne harmonizovaného systému (GHS) pre klasifikáciu chemikálií, ktoré spôsobujú akútnu toxicitu (9).

Testovacie laboratórium posúdi všetky dostupné informácie o testovanej látke pred uskutočnením štúdie. Takéto informácie budú obsahovať identitu a chemickú štruktúru látky, jej fyzikálno-chemické vlastnosti, výsledky všetkých ostatných *in vitro* alebo *in vivo* testov toxicity s látkou, toxikologické údaje o štrukturálne príbuzných látkach a predpokladané použitie(-ia) látky. Tieto informácie sú potrebné na ubezpečenie všetkých zainteresovaných, že test je relevantný na ochranu zdravia ľudí a pomôže pri výbere vhodnej počiatočnej dávky.

▼B

1.2. DEFINÍCIE

Akútna orálna toxicita: vzťahuje sa na tie nepriaznivé účinky, ktoré sa vyskytnú po orálnom podaní jednorazovej dávky látky alebo viacnásobných dávok podávaných v priebehu 24 hodín.

Oneskorená smrť: znamená, že zviera neuhynie ani sa nejaví, že je moribundné, v priebehu 48 hodín, ale uhynie neskôr v priebehu 14-dňového obdobia pozorovania.

Dávka: množstvo podanej testovanej látky. Dávka je vyjadrená ako hmotnosť testovanej látky na jednotku hmotnosti pokusného zvieraťa (napr. mg/kg).

Zrejmá toxicita: všeobecný termín opisujúci jasné príznaky toxicity po podaní testovanej látky [príklady pozri v (3)], ktoré sú také, že pri podaní najbližšej najvyššej stabilnej dávky sa dá očakávať buď silná bolesť a pretrvávajúce príznaky silného utrpenia, moribundný stav [kritériá sú uvedené v Humane Endpoints Guidance Document (8)], alebo pravdepodobná mortalita u väčšiny zvierat.

GHS: Globálne harmonizovaný klasifikačný systém pre chemické látky a zmesi. Spoločný projekt OECD (zdravie ľudí a životné prostredie), Výboru expertov OSN pre prepravu nebezpečného tovaru (fyzikálno-chemické vlastnosti) a ILO (oznamovanie nebezpečenstva) a koordinovaný v rámci Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC).

Blížiaca sa smrť: keď sa očakáva moribundný stav pred ďalším plánovaným obdobím pozorovania. Príznaky, ktoré sú príznačné pre tento stav u hlodavcov, by mohli zahŕňať kŕče, polohu na boku, polohu v ľahu a triašku. [Ďalšie informácie pozri v Humane Endpoint Guidance Document (8).]

LD_{50} (stredná smrteľná dávka): je štatistický odvodená jednorazová dávka látky, pri ktorej sa dá očakávať, že spôsobí úhyn 50 % zvierat po orálnom podaní. Hodnota LD_{50} je vyjadrená ako hmotnosť testovanej látky na jednotku hmotnosti pokusného zvieraťa (mg/kg).

Limitná dávka: sa vzťahuje na dávku nad hornou hranicou testovania (2 000 alebo 5 000 mg/kg).

Moribundný stav: stav umierania alebo neschopnosti prežiť, dokonca aj pri liečbe. [Ďalšie informácie pozri v Humane Endpoint Guidance Document (8).]

Predvídateľná smrť: prítomnosť klinických príznakov charakteristických pre smrť v známom čase v budúcnosti pred plánovaným ukončením experimentu, napríklad neschopnosť prijímať vodu alebo jedlo. [Ďalšie informácie pozri v Humane Endpoint Guidance Document (8).]

▼B

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Skupine zvierat rovnakého pohlavia sa postupne podávajú stabilné dávky 5, 50, 300 a 2 000 mg/kg (výnimočne sa môže uvažovať o podaní ďalšej stabilnej dávky 5 000 mg/kg, pozri oddiel 1.6.2). Na základe predbežnej štúdie sa zvolí počiatočná dávka, pri ktorej sa očakáva, že spôsobí určité príznaky toxicity bez toho, aby spôsobila vážne toxické účinky alebo mortalitu. Klinické príznaky a podmienky, ktoré sa spájajú s bolesťou, utrpením a blížiacou sa smrťou, sú podrobne uvedené v samostatnom usmerňovacom dokumente OECD (8). Ďalším skupinám zvierat sa môžu podávať vyššie alebo nižšie stabilné dávky v závislosti od prítomnosti alebo neprítomnosti príznakov toxicity alebo mortality. Tento postup pokračuje po dávku spôsobujúcu zrejmú toxicitu alebo po zistenie najviac jedného uhynutia, alebo keď nie sú viditeľné žiadne účinky pri najvyššej dávke, alebo keď sa vyskytnú uhynutia pri najnižšej dávke.

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Výber druhu zvierat**

Spomedzi živočíchov z druhu hlodavcov sa pokiaľ možno používa potkan, aj keď sa môže použiť aj iný druh hlodavca. Zvyčajne sa používajú samice (7). Je to preto, že prehľady bežných LD_{50} testov uverejnené v odbornej literatúre uvádzajú, že zvyčajne je malý rozdiel v citlivosti medzi pohlaviami, ale v tých prípadoch, keď sa pozorujú rozdiely, sú samice zvyčajne mierne citlivejšie (10). Ak však z poznatkov o toxikologických alebo toxikokinetických vlastnostiach štrukturálne príbuzných chemikálií vyplýva, že samce môžu byť citlivejšie, potom sa použije toto pohlavie. Ak sa test uskutočňuje na samcoch, je potrebné uviesť primerané zdôvodnenie.

Používajú sa zdravé mladé dospelé zvieratá bežne používaných laboratórnych kmeňov. Samice majú byť panenské a negravidné. Každé zviera má byť na začiatku dávkovania vo veku od 8 do 12 týždňov a jeho hmotnosť má byť v intervale ± 20 % priemernej hmotnosti všetkých zvierat, ktorým sa predtým podala dávka.

1.4.2. **Podmienky umiestnenia a kŕmenia**

Teplota miestnosti pre pokusné zvieratá má byť 22 °C (± 3 °C). Aj keď relatívna vlhkosť má byť aspoň 30 % a nemala by prevyšovať 70 %, okrem obdobia počas čistenia miestnosti má dosahovať 50 % – 60 %. Osvetlenie má byť umelé, v rytme 12 hodín svetlo, 12 hodín tma. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Zvieratá môžu byť v klietkach po skupinách podľa dávok, ale počet zvierat na klietku musí umožniť zreteľné pozorovanie každého zvieraťa.

1.4.3. **Príprava zvierat**

Zvieratá sú náhodne vybrané, označené tak, aby sa umožnila jednotlivá identifikácia, a držia sa v klietkach aspoň 5 dní pred začiatkom podávania látky, aby sa im umožnila aklimatizácia na laboratórne podmienky.

▼B

1.4.4. **Príprava dávok**

Testované látky sa zvyčajne podávajú v stálom objeme počas celého rozsahu dávok, ktoré sa majú testovať zmenou koncentrácie dávkovaného prípravku. Ak sa však má testovať kvapalný konečný produkt alebo zmes, použitie neriedenej testovanej látky, t. j. pri konštantnej koncentrácii, môže byť vhodnejšie pre následné stanovenie rizika tejto látky a požadujú ho niektoré regulačné orgány. V každom prípade sa nesmie prevýšiť maximálny objem podávanej dávky. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže jednorazovo podať, závisí od veľkosti pokusného zvieraťa. U hlodavcov by objem zvyčajne nemal presiahnuť 1 ml/100 g telesnej hmotnosti: v prípade vodných roztokov sa však môže uvažovať o 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Pokiaľ ide o zloženie dávkovaného prípravku, odporúča sa, pokiaľ je to možné, použitie vodného roztoku/-suspenzie/emulzie, za ktorým v poradí nasleduje roztok/suspenzia/-emulzia v oleji (napr. kukuričný olej) a potom prípadne roztok v iných nosičoch. Pre nosiče, ktoré sú iné ako voda, by mali byť známe toxikologické charakteristiky. Dávky musia byť pripravené tesne pred podávaním, pokiaľ nie je známa a prijateľná stabilita prípravku počas jeho používania.

1.5. POSTUP

1.5.1. **Podávanie dávok**

Testovaná látka sa podáva ako jednorazová dávka cez sondu s použitím žalúdočnej sondy alebo vhodnej intubačnej kanyly. Za nezvyčajných okolností, keď nie je možná jednorazová dávka, môže sa dávka podávať v menších množstvách v priebehu maximálne 24 hodín.

Zvieratá sa pred podaním dávky vyhladujú (napr. potkanom sa cez noc zadrží potrava, ale nie voda; myšiam sa na 3 – 4 hodiny zadrží potrava, ale nie voda). Po období hladovania sa zvieratá odvážia a podá sa im testovaná látka. Po podaní látky sa potrava môže zadržať na ďalšie 3 – 4 hodiny potkanom alebo myšiam na 1 – 2 hodiny. Ak sa dávka podáva po častiach počas určitého obdobia, môže byť potrebné poskytnúť zvieratám potravu a vodu v závislosti od dĺžky obdobia.

1.5.2. **Predbežná štúdia**

Účelom predbežnej štúdie je umožniť výber vhodnej počiatočnej dávky pre základnú štúdiu. Testovaná látka sa podáva jednotlivým zvieratám postupne podľa postupového diagramu v prílohe 1. Predbežná štúdia je hotová, keď možno vykonať rozhodnutie o počiatočnej dávke pre základnú štúdiu (alebo ak sa vyskytne uhynutie pri najnižšej stabilnej dávke).

Počiatočná dávka sa v prípade predbežnej štúdie vyberie zo stabilných dávok 5, 50, 300 a 2 000 mg/kg ako dávka, pri ktorej sa očakáva, že spôsobí zrejmú toxicitu, ktorá je založená pokiaľ možno na dôkaze z *in vivo* a *in vitro* údajov pre tú istú chemikáliu a pre štrukturálne príbuzné chemikálie. Ak takéto informácie chýbajú, bude počiatočná dávka 300 mg/kg.

Medzi podaním jednotlivých dávok každému zvieraťu je časový interval aspoň 24 hodín. Všetky zvieratá sa pozorujú aspoň 14 dní.

▼B

Výnimočne, a iba v odôvodnených prípadoch na základe osobitných regulačných potrieb, sa môže zohľadniť použitie ďalšej vyššej stabilnej dávky 5 000 mg/kg (pozri prílohu 3). Z dôvodu starostlivosti o zvieratá sa pokusy na zvieratách v rozsahoch GHS kategórie 5 (2 000 – 5 000 mg/kg) neodporúčajú a uvážia sa iba v prípade veľkej pravdepodobnosti, že výsledky takéhoto testu sú bezprostredne dôležité pre ochranu zdravia ľudí a zvierat alebo ochranu životného prostredia.

V prípadoch, keď zviera testované pri najnižšej stabilnej dávke (5 mg/kg) v predbežnej štúdii uhynie, je zvyčajným postupom, že štúdia sa ukončí a látka sa zaradí do GHS kategórie 1 (ako je uvedené v prílohe 1). Ak sa však vyžaduje ďalšie potvrdenie klasifikácie, môže sa vykonať tento voliteľný doplnkový postup. Druhému zvieraťu sa podá dávka 5 mg/kg. Ak toto druhé zviera uhynie, potom sa potvrdí GHS kategória 1 a štúdia sa ihneď ukončí. Ak druhé zviera prežije, potom sa maximálne trom ďalším zvieratám podá dávka 5 mg/kg. Pre výskyt veľkého rizika mortality sa týmto zvieratám z dôvodu starostlivosti o zvieratá podá dávka postupne. Časový interval medzi podaním dávky každému zvieraťu má byť dostatočný na to, aby sa stanovila pravdepodobnosť prežitia predchádzajúceho zvieraťa. Ak sa vyskytne druhé uhynutie, postupnosť podávania dávok sa ihneď ukončí a žiadnym ďalším zvieratám sa dávky nepodajú. Keďže výskyt druhého uhynutia (bez ohľadu na počet pokusných zvierat v čase ukončenia) patrí do výsledku A (2 alebo viac uhynutí), postupuje sa podľa klasifikačného pravidla prílohy 2 pri stabilnej dávke 5 mg/kg (kategória 1, ak sa vyskytne 2 alebo viac uhynutí, alebo kategória 2, ak sa nevyskytne viac ako 1 uhynutie). Okrem toho príloha 4 poskytuje usmernenie pre klasifikáciu v systéme EÚ, až kým sa nezavedie nový GHS.

1.5.3. **Základná štúdia**

1.5.3.1. *Počet zvierat a dávky*

Opatrenia, ktoré sa majú prijať po testovaní s počiatočnou dávkou, sa uvádzajú v postupových diagramoch v prílohe 2. Vyžaduje sa jedno z troch opatrení; buď sa testovanie ukončí a priradí príslušná trieda klasifikácie nebezpečenstva, testuje sa pri vyššej stabilnej dávke, alebo sa testuje pri nižšej stabilnej dávke. Na ochranu zvierat sa však v základnej štúdii nezopakuje dávka, ktorá spôsobila uhynutie v predbežnej štúdii (pozri prílohu 2). Zo skúseností vyplýva, že najpravdepodobnejším výsledkom pri počiatočnej dávke bude to, že látku možno klasifikovať, a nie je potrebné ďalšie testovanie.

Zvyčajne sa používa celkove päť zvierat rovnakého pohlavia pre každú skúmanú dávku. K týmto piatim zvieratám patrí jedno zviera z predbežnej štúdie, ktorému sa podala zvolená dávka, a ďalšie štyri zvieratá (okrem výnimočného prípadu, keď sa dávka použitá v základnej štúdii nezahrnula do predbežnej štúdie).

Časový interval medzi dávkovaním s každou veľkosťou dávky je určený nástupom, trvaním a závažnosťou príznakov toxicity. Ďalšia dávka sa podá zvieratám až po ubezpečení, že zvieratá, ktorým sa predtým podala dávka, prežili. Podľa potreby sa odporúča interval 3 alebo 4 dni medzi jednotlivými dávkami, aby sa umožnilo pozorovanie oneskorenej toxicity. Časový interval sa môže nastaviť podľa potreby, napr. v prípade nepresvedčivej reakcie.

▼B

Ak sa uvažuje o použití vyššej stabilnej dávky 5 000 mg/kg, postupuje sa podľa postupu uvedeného v prílohe 3 (pozri tiež oddiel 1.6.2).

1.5.3.2. *Limitný test*

Limitný test sa pokiaľ možno používa v situáciách, keď experimentátor má informácie, z ktorých vyplýva, že testovaný materiál je pravdepodobne netoxický, t. j. že je toxický iba v prípade, keď prevyšuje predpismi stanovené limitné dávky. Informácie o toxicite testovaného materiálu možno získať z poznatkov o podobných testovaných látkach alebo podobných testovaných zmesiach alebo produktoch pri zohľadnení identity a percenta zložiek, o ktorých je známe, že sú toxikologicky významné. V tých situáciách, keď je málo informácií alebo nie sú informácie o jeho toxicite, alebo v ktorých sa očakáva, že testovaný materiál bude toxický, je potrebné vykonať základný test.

Pri zvyčajnom postupe sa počiatočná dávka predbežnej štúdie 2 000 mg/kg (alebo výnimočne 5 000 mg/kg) následne podá ďalším štyrom zvieratám, čo slúži ako limitný test v prípade tohto usmernenia.

1.6. POZOROVANIA

Zvieratá sa vyšetrujú individuálne po podaní dávky aspoň raz počas prvých 30 minút, pravidelne počas prvých 24 hodín, osobitne pozorne počas prvých 4 hodín, a potom každý deň počas celkove 14 dní okrem prípadu, keď je potrebné zvieratá vylúčiť zo štúdie a z dôvodu starostlivosti o zvieratá humánnym spôsobom usmrtiť alebo keď sa zistí, že uhynuli. Dĺžka pozorovania by sa však nemala pevne určiť. Určí sa na základe toxických reakcií, času nástupu a dĺžky času zotavenia a malo by sa teda umožniť jej predĺženie, ak sa to pokladá za potrebné. Časy, keď sa objavia a zmiznú príznaky toxicity, sú dôležité, predovšetkým v prípade tendencie oneskorenia toxických príznakov (11). Všetky pozorovania sa systematicky zaznamenajú, pričom každé zviera má individuálny záznam.

Ďalšie vyšetrenia budú potrebné, ak zvieratá naďalej vykazujú príznaky toxicity. Pri vyšetreniach sa venuje pozornosť zmenám na pokožke a srsti, očiach a slizniciach a tiež respiračnému, obehovému, autonómnemu a centrálnemu nervovému systému a somatomotorickej aktivite a spôsobu správania. Pozornosť sa zameriava na pozorovanie triašky, kŕčov, slinenia, hnačky, letargie, spánku a kómy. Zohľadnia sa zásady a kritériá zosumarizované v Humane Endpoints Guidance Document (8). Zvieratá nachádzajúce sa v moribundnom stave alebo tie, ktoré vykazujú silné bolesti alebo pretrvávajúce príznaky veľkého utrpenia, sa humánnym spôsobom usmrtia. Keď sa zvieratá usmrtia z humánnych dôvodov alebo sa nájdu uhynuté, je potrebné čo možno najpresnejšie zaznamenať čas uhynutia.

1.6.1. **Telesná hmotnosť**

Hmotnosť jednotlivých zvierat sa stanoví krátko pred podaním testovanej látky a potom aspoň každý týždeň. Zmeny hmotnosti sa vypočítajú a zaznamenajú. Na konci testu sa zvieratá, ktoré prežili, odvážia a potom humánnym spôsobom usmrtia.

▼B

1.6.2. **Patológia**

Všetky testované zvieratá (vrátane tých, ktoré uhynú počas testu alebo sú vylúčené zo štúdie z dôvodu starostlivosti o zvieratá) sa podrobia autopsii. Všetky makroskopické patologické zmeny u každého zvieraťa sa zaznamenajú. Môže sa uvažovať aj o mikroskopickom vyšetrení orgánov dokazujúcom makroskopické patologické nálezy u zvierat, ktoré prežili 24 alebo viac hodín po podaní počiatočnej dávky, ktoré môže poskytnúť užitočné informácie.

2. **ÚDAJE**

O jednotlivých zvieratách sa poskytujú informácie. Okrem toho sa všetky údaje zosumarizujú vo forme tabuliek, kde sa uvedie pre každú pokusnú skupinu počet použitých zvierat, počet zvierat vykazujúcich príznaky toxicity, počet zvierat, ktoré sa našli uhynuté počas testu, alebo boli usmrtené z humánnych dôvodov, čas uhynutia jednotlivých zvierat, popis časového priebehu toxických účinkov a reverzibility a pitevné nálezy.

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí podľa potreby obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

— fyzikálny charakter, čistota a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti (vrátane izomerizácie),

— identifikačné údaje vrátane čísla CAS.

Nosič (v prípade potreby):

— zdôvodnenie výberu nosiča, ak je iný ako voda.

Pokusné zvieratá:

— použitý druh/kmeň,

— mikrobiologický stav zvierat, ak je známy,

— počet, vek a pohlavie zvierat (v prípade potreby vrátane zdôvodnenia, prečo sa použili samce namiesto samíc),

— zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo atď.

Testovacie podmienky:

— údaje o zložení testovanej látky vrátane údajov o fyzikálnej forme podávaného materiálu,

— údaje o podávaní testovanej látky vrátane objemov dávok a čase podávania,

— údaje o kvalite krmiva a vody (vrátane druhu krmiva/zdroja, zdroja vody),

— zdôvodnenie výberu počiatočnej dávky.

▼B

Výsledky:

— tabuľkové spracovanie údajov o reakcii a veľkosti dávky pre každé zviera (t. j. zvieratá vykazujúce príznaky toxicity vrátane mortality, povahy, závažnosti a trvania účinkov),

— tabuľkové spracovanie telesnej hmotnosti a zmien telesnej hmotnosti,

— hmotnosti jednotlivých zvierat v deň podania dávky, potom v týždňových intervaloch a v čase uhynutia alebo usmrtenia,

— dátum a čas uhynutia v prípade vopred naplánovaného usmrtenia,

— časový priebeh nástupu príznakov toxicity a či tieto príznaky boli reverzibilné pre každé zviera,

— pitevné nálezy a histopatologické nálezy pre každé zviera, ak sú k dispozícii.

Diskusia a interpretácia výsledkov.

Závery.

4. **ODKAZY**

(1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. Human Toxicol., 3, 85 – 92.

(2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. Human Toxicol., 6, 279 – 291.

(3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD_{50} test. Fd. Chem. Toxicol. 28, 469 – 482.

(4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. Fd. Chem. Toxicol., 30, 313 – 324.

(5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. Human Exptl. Toxicol. 14, 315 – 323. Human Exptl. Toxicol.

(6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. Hum. Exp. Toxicol., 21, 183 – 196.

(7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assesment N. 19.

▼B

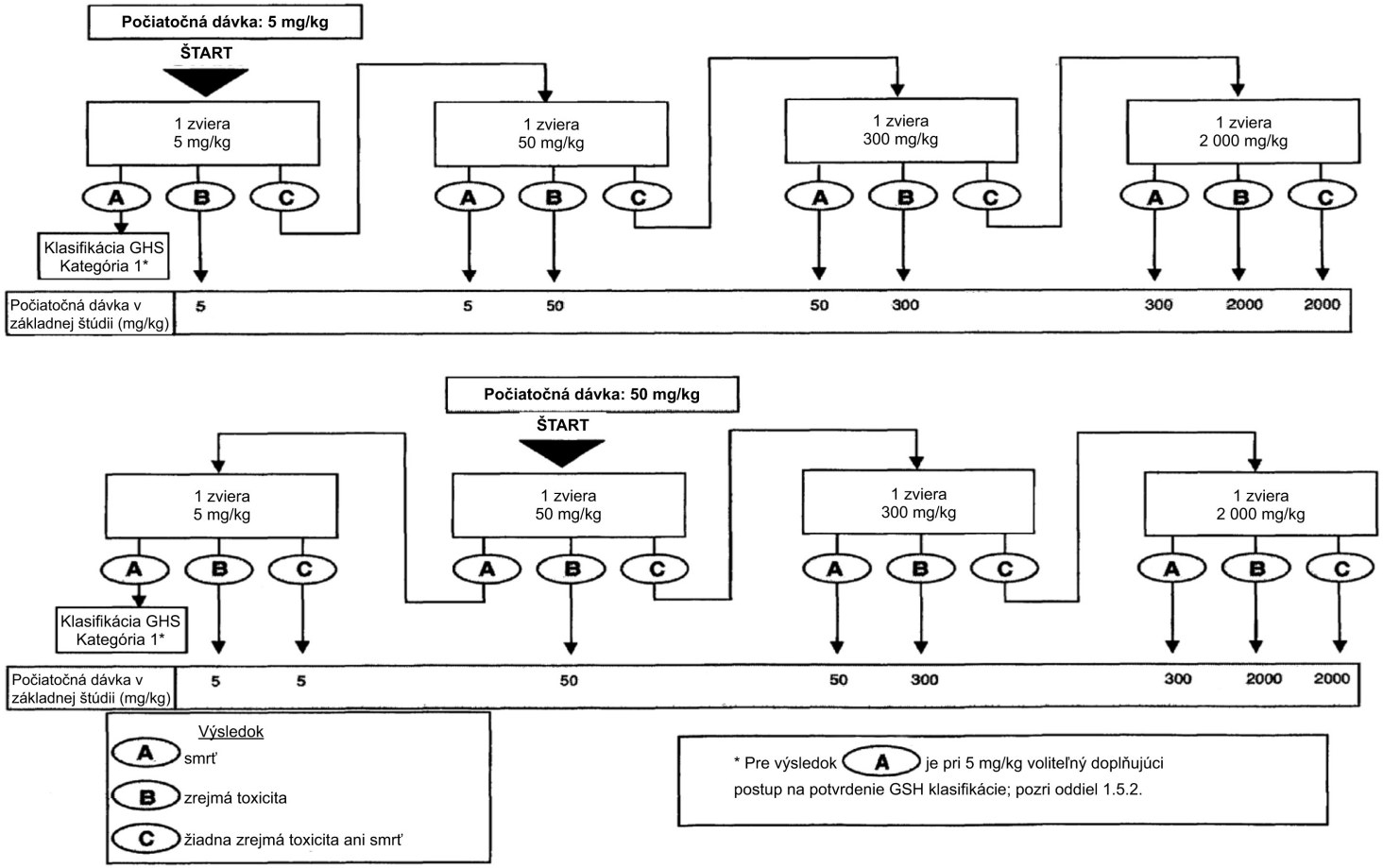
(9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, s. 11 [http://webnet1.oecd.org/-oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-1]. no-24-no-0,FF.html].

(10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD50, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol. 33, 223 – 231.

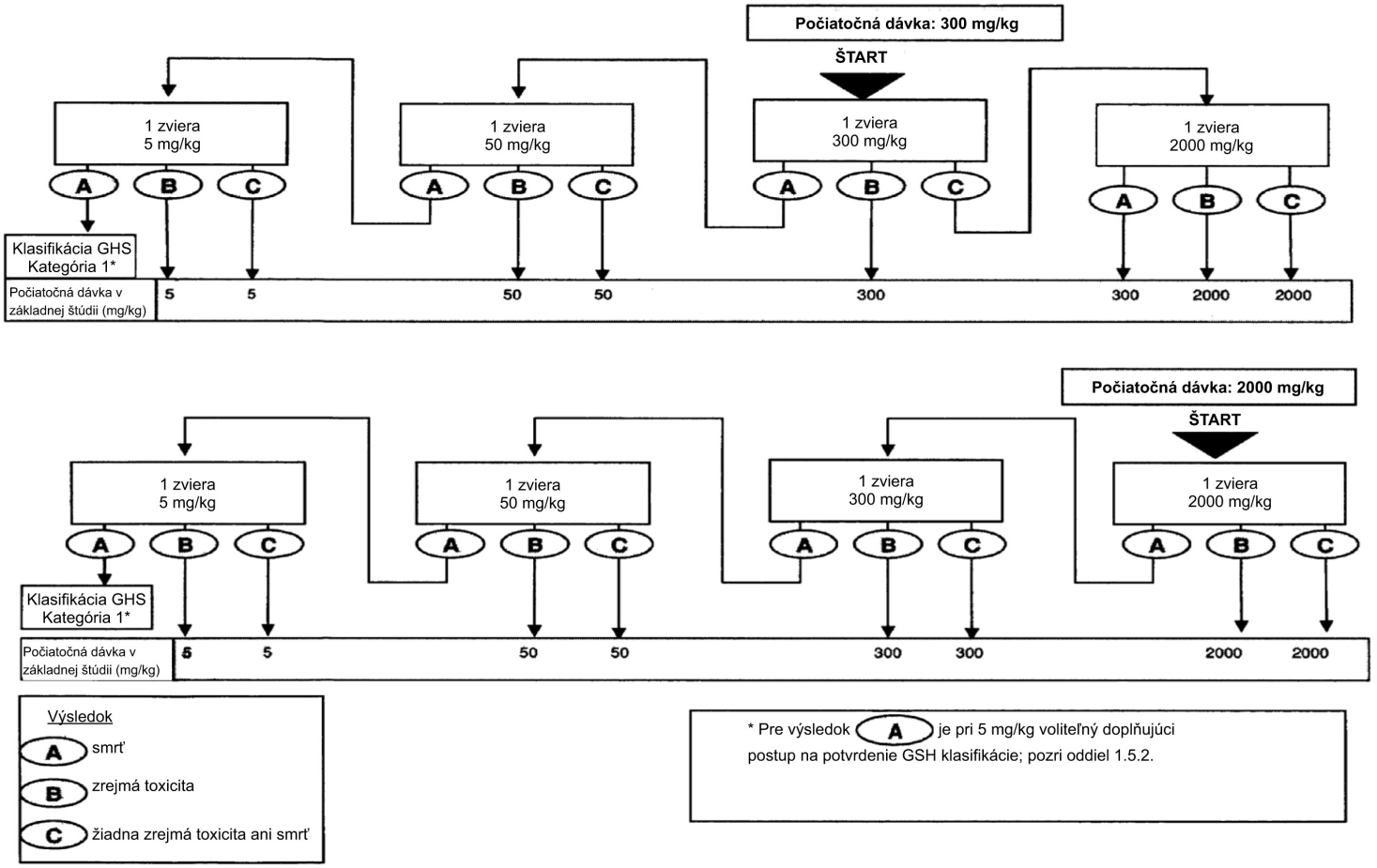
(11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: Principles and Methods of Toxicology. 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

PRÍLOHA 1:

POSTUPOVÝ DIAGRAM PRE PREDBEŽNÚ ŠTÚDIU

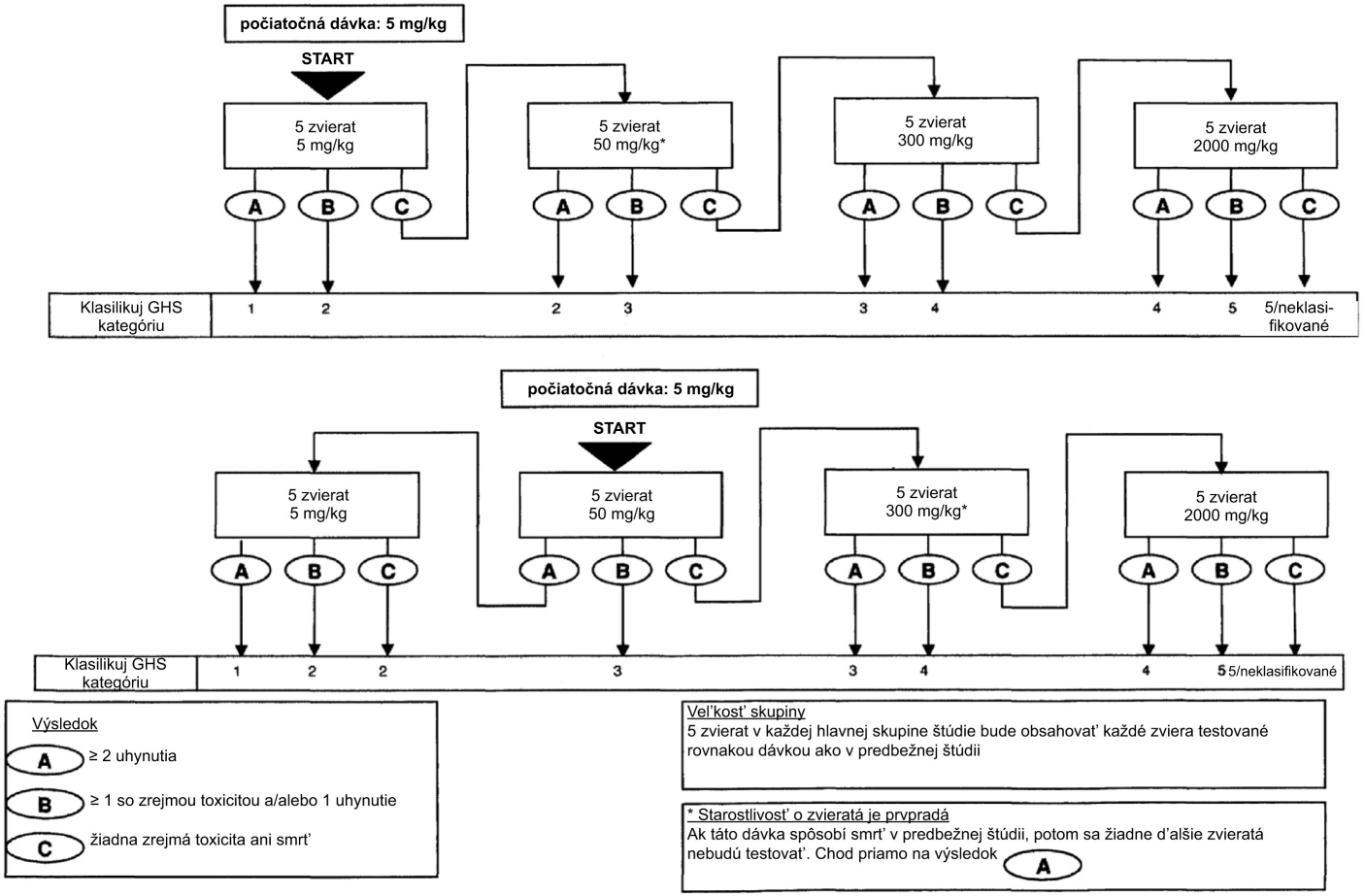


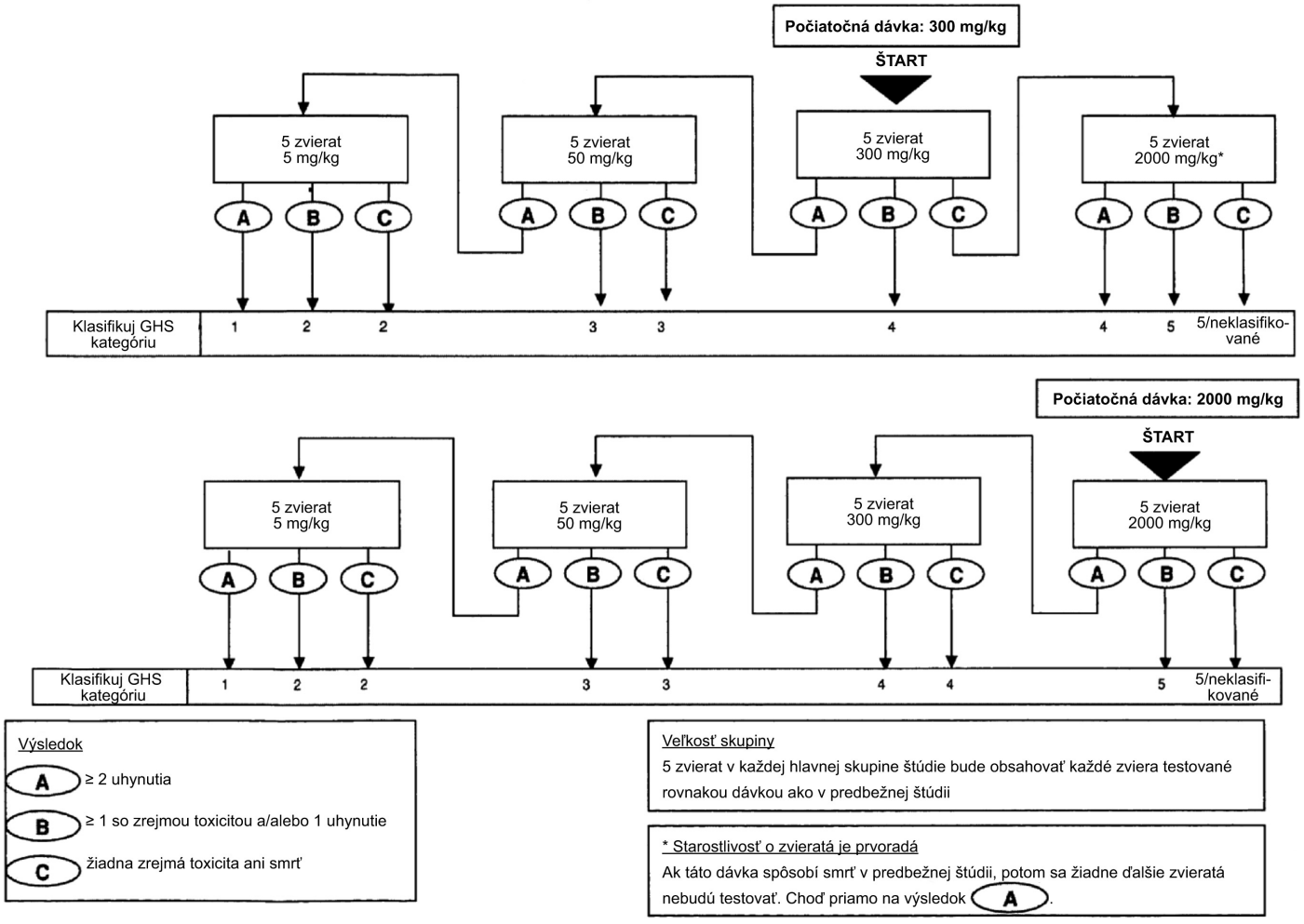
▼B


Počiatočná dávka: 300 mg/kg
ŠTART
1 zviera 5 mg/kg
1 zviera 50 mg/kg
1 zviera 300 mg/kg
1 zviera 2000 mg/kg
A B C
Klasifikácia GHS Kategória 1*
Počiatočná dávka v základnej štúdii (mg/kg)
5 5 50 50 300 300 2000 2000
Počiatočná dávka: 2000 mg/kg
ŠTART
1 zviera 5 mg/kg
1 zviera 50 mg/kg
1 zviera 300 mg/kg
1 zviera 2000 mg/kg
A B C
Klasifikácia GHS Kategória 1*
Počiatočná dávka v základnej štúdii (mg/kg)
5 5 50 50 300 300 2000 2000
Výsledok
A smrť
B zrejmá toxicita
C žiadna zrejmá toxicita ani smrť
* Pre výsledok A je pri 5 mg/kg voliteľný doplňujúci postup na potvrdenie GSH klasifikácie; pozri oddiel 1.5.2.

PRÍLOHA 2

POSTUPOVÝ DIAGRAM PRE ZÁKLADNÚ ŠTÚDIU




Počiatočná dávka: 300 mg/kg
ŠTART
5 zvierat 5 mg/kg
5 zvierat 50 mg/kg
5 zvierat 300 mg/kg
5 zvierat 2000 mg/kg*
A B C
Klasifikuj GHS kategóriu
1 2 2 3 3 4 4 5 5/neklasifiko-vané
Počiatočná dávka: 2000 mg/kg
ŠTART
5 zvierat 5 mg/kg
5 zvierat 50 mg/kg
5 zvierat 300 mg/kg
5 zvierat 2000 mg/kg
Klasifikuj GHS kategóriu
1 2 2 3 3 4 4 5 5/neklasifi-kované
Výsledok
A ≥ 2 uhynutia
B ≥ 1 so zrejmou toxicitou a/alebo 1 uhynutie
C žiadna zrejmá toxicita ani smrť
Veľkosť skupiny
5 zvierat v každej hlavnej skupine štúdie bude obsahovať každé zviera testované rovnakou dávkou ako v predbežnej štúdii
* Starostlivosť o zvieratá je prvoradá
Ak táto dávka spôsobí smrť v predbežnej štúdii, potom sa žiadne ďalšie zvieratá nebudú testovať. Choď priamo na výsledok A.

▼B

Príloha 3

KRITÉRIÁ KLASIFIKÁCIE TESTOVANÝCH LÁTOK S OČAKÁVANÝMI HODNOTAMI LD_{50} VYŠŠÍMI AKO 2 000 MG/KG, KTORÉ NIE JE POTREBNÉ TESTOVAŤ

Kritériá pre kategóriu nebezpečenstva 5 sú určené na umožnenie identifikácie testovaných látok s relatívne nízkym nebezpečenstvom akútnej toxicity, ale ktoré za určitých podmienok môžu predstavovať nebezpečenstvo pre zraniteľnejšie skupiny obyvateľstva. Predpokladá sa, že tieto látky majú orálnu alebo dermálnu LD_{50} v rozsahu 2 000 – 5 000 mg/kg alebo rovnocennú s dávkami pre iné spôsoby podávania. Testované látky sa klasifikujú do kategórie nebezpečenstva, ktorá je definovaná ako: 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (kategória 5 v GHS) v týchto prípadoch:

a) ak sú zaradené do tejto kategórie na základe niektorej testovacej schémy z prílohy 2 na základe výskytov mortality;

b) ak je už dostupný spoľahlivý dôkaz, z ktorého vyplýva, že LD_{50} je v rozsahu hodnôt kategórie 5, alebo z iných štúdií na zvieratách alebo toxických účinkov u ľudí vyplývajú obavy z akútnych dôsledkov pre zdravie ľudí;

c) pomocou extrapolácie, odhadu a merania údajov, ak nie je potvrdené zaradenie do vyššej triedy nebezpečenstva, a

   — sú k dispozícii spoľahlivé informácie, z ktorých vyplývajú závažné toxické účinky u ľudí, alebo

   — sa zistila mortalita pri testovaní s orálnym podávaním dávok až do hodnôt kategórie 4, alebo

   — ak expertné posúdenie potvrdí závažné klinické príznaky toxicity pri testovaní až do hodnôt kategórie 4 okrem hnačky, zježenia alebo neupravenej srsti, alebo

   — ak expertné posúdenie potvrdí spoľahlivé informácie, z ktorých vyplýva na základe iných štúdií na zvieratách možnosť závažných akútnych účinkov.

TESTOVANIE S DÁVKAMI NAD 2 000 MG/KG

Výnimočne a iba v odôvodnených prípadoch na základe osobitných regulačných potrieb sa môže zohľadniť použitie ďalšej vyššej stabilnej dávky 5 000 mg/kg. Vzhľadom na potrebu ochrany zvierat sa testovanie s 5 000 mg/kg neodporúča a môže sa uvážiť iba v prípade veľkej pravdepodobnosti, že výsledky takéhoto testu by mohli byť bezprostredne dôležité pre ochranu zdravia ľudí a zvierat (9).

Predbežná štúdia

Pravidlá rozhodnutia upravujúce postupovú metódu uvedenú v prílohe 1 sa rozširujú o dávku 5 000 mg/kg. Preto keď sa ako počiatočná dávka v predbežnej štúdii použije dávka 5 000 mg/kg, na základe výsledku A (smrť) bude potrebné, aby sa testovalo druhé zviera s dávkou 2 000 mg/kg; výsledky B a C (zrejmá toxicita alebo žiadna toxicita) umožnia, aby sa dávka 5 000 mg/kg zvolila ako počiatočná dávka v základnej štúdii. Podobne ak sa použije iná počiatočná dávka ako 5 000 mg/kg, potom testovanie pokračuje s 5 000 mg/kg na základe výsledkov B alebo C pri veľkosti dávky 2 000 mg/kg; následne výsledok A pri dávke 5 000 mg/kg predurčí počiatočnú dávku v základnej štúdii s veľkosťou dávky 2 000 mg/kg a výsledky B a C predurčia počiatočnú dávku pre základnú štúdiu s veľkosťou 5 000 mg/kg.

▼B

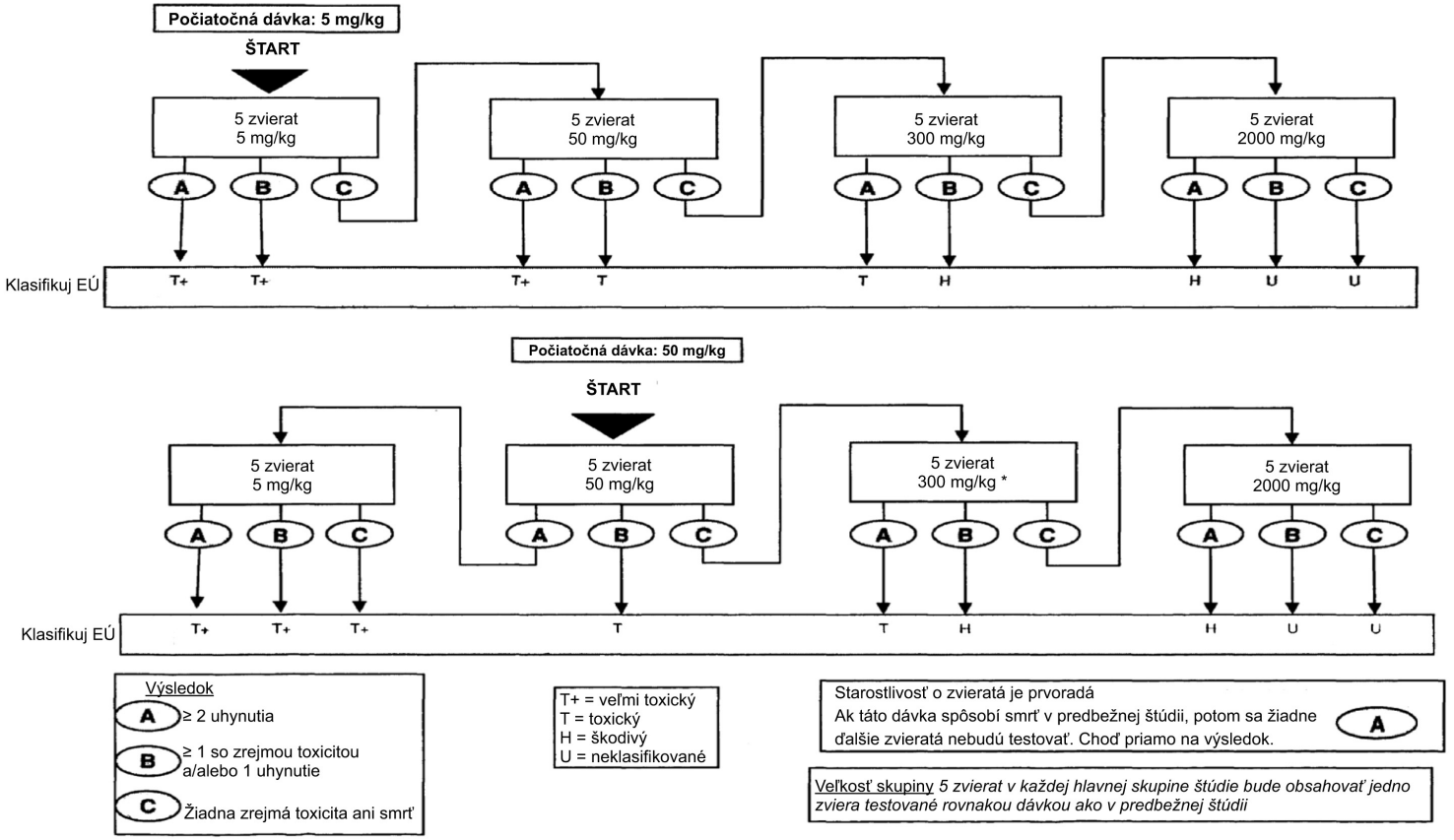
Základná štúdia

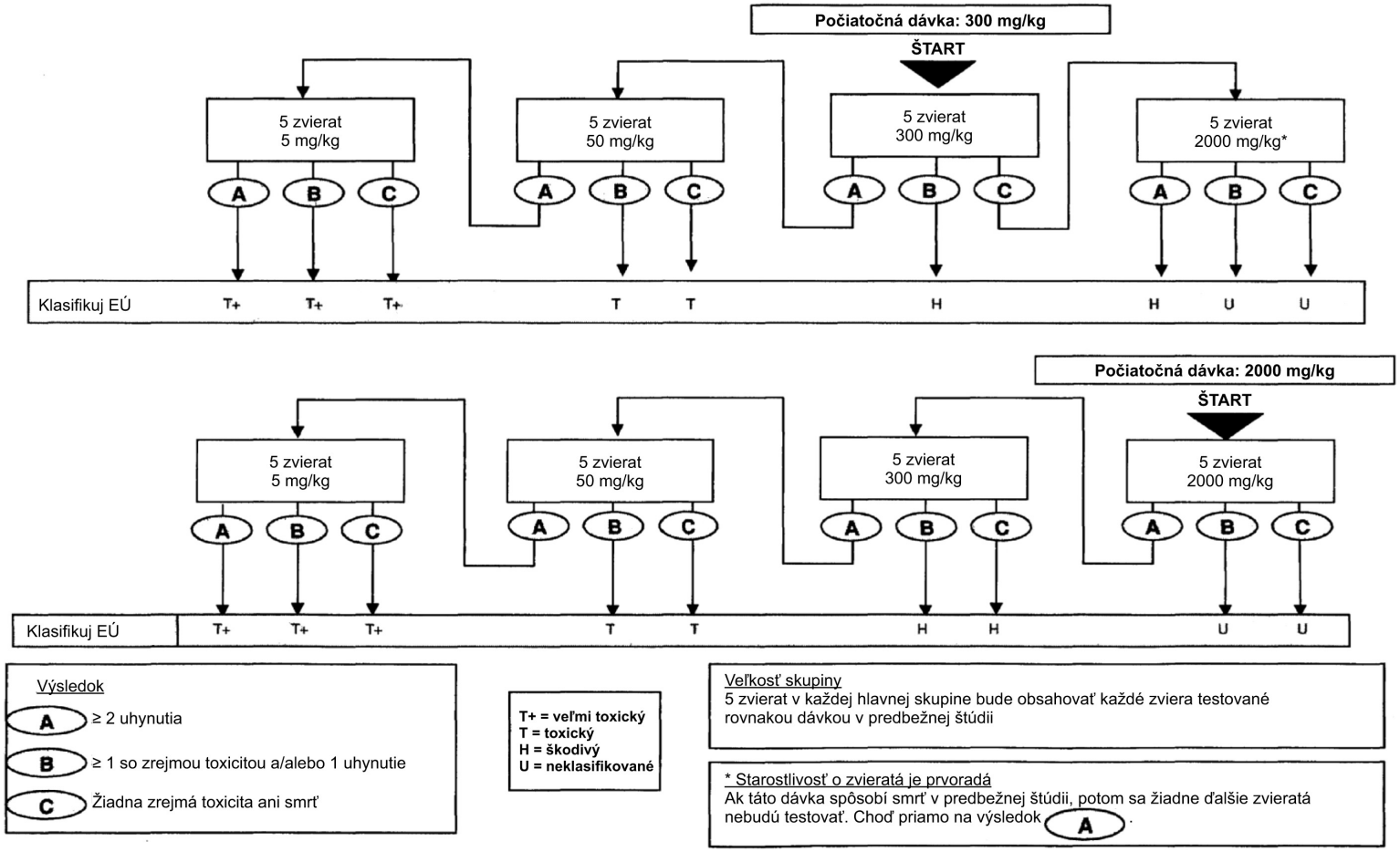
Pravidlá rozhodnutia upravujúce postupovú metódu uvedenú v prílohe 2 sa rozširujú o dávku 5 000 mg/kg. Preto keď sa ako počiatočná dávka v základnej štúdii použije dávka 5 000 mg/kg, na základe výsledku A (≥ 2 uhynuté zvieratá) bude potrebné, aby sa testovala druhá skupina zvierat s dávkou 2 000 mg/kg; výsledok B (zrejmá toxicita a/alebo ≤ 1 uhynuté zviera) alebo C (žiadna toxicita) bude mať za následok, že látka sa nebude klasifikovať podľa GHS. Podobne ak sa použije iná počiatočná dávka ako 5 000 mg/kg, potom testovanie pokračuje do 5 000 mg/kg na základe výsledku C pri veľkosti dávky 2 000 mg/kg; následne výsledok A pri dávke 5 000 mg/kg bude mať za následok, že látka sa zaradí do kategórie 5 GHS a výsledky B alebo C povedú k tomu, že sa látka nebude klasifikovať.

PRÍLOHA 4

TESTOVACIA METÓDA B.1a

Usmernenie pre klasifikáciu podľa schémy EÚ na prekonanie prechodného obdobia do úplného zavedenia Globálne harmonizovaného klasifikačného systému (GHS)




Počiatočná dávka: 300 mg/kg
ŠTART
5 zvierat 5 mg/kg
5 zvierat 50 mg/kg
5 zvierat 300 mg/kg
5 zvierat 2000 mg/kg*
A B C
Klasifikuj EÚ
T+ T+ T+ T T H H U U
Počiatočná dávka: 2000 mg/kg
ŠTART
5 zvierat 5 mg/kg
5 zvierat 50 mg/kg
5 zvierat 300 mg/kg
5 zvierat 2000 mg/kg
A B C
Klasifikuj EÚ
T+ T+ T+ T T H H U U
Výsledok
A ≥ 2 uhynutia
B ≥ 1 so zrejmou toxicitou a/alebo 1 uhynutie
C Žiadna zrejmá toxicita ani smrť
T+ = veľmi toxický
T = toxický
H = škodivý
U = neklasifikované
Veľkosť skupiny
5 zvierat v každej hlavnej skupine bude obsahovať každé zviera testované rovnakou dávkou v predbežnej štúdii
* Starostlivosť o zvieratá je prvoradá
Ak táto dávka spôsobí smrť v predbežnej štúdii, potom sa žiadne ďalšie zvieratá nebudú testovať. Choď priamo na výsledok A.

▼B

B.1b. **AKÚTNA ORÁLNA TOXICITA – METÓDA TRIEDY AKÚTNEJ TOXICITY**

1. **METÓDA**

Táto testovacia metóda je rovnocenná s OECD TG 423 (2001).

1.1. ÚVOD

Metóda triedy akútnej toxicity (1), uvedená v tomto teste, je postupnou metódou, pri ktorej sa na každý krok použijú 3 zvieratá rovnakého pohlavia. V závislosti od mortality a/alebo ich moribundného stavu môžu byť potrebné priemerne 2 až 4 kroky na posúdenie akútnej toxicity testovanej látky. Táto metóda je reprodukovateľná, používa sa pri nej veľmi málo zvierat a umožňuje zatriediť látky podobne ako iné testovacie metódy akútnej toxicity. Metóda triedy akútnej toxicity je založená na biometrických hodnoteniach (2) (3) (4) (5) so stabilnými dávkami dostatočne odlíšenými, aby umožnili zatriedenie látky na klasifikačné účely a posúdenie nebezpečenstva. Metóda, ktorá bola prijatá v roku 1996, bola rozsiahlo validovaná pokusmi *in vivo* v porovnaní s údajmi LD_{50} získanými z literatúry, tak na národnej (6), ako aj na medzinárodnej úrovni (7).

Usmernenie pre výber najvhodnejšej testovacej metódy na daný účel možno nájsť v Usmerňujúcom dokumente o testovaní akútnej orálnej toxicity [Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing (8)]. Tento usmerňujúci dokument obsahuje aj doplňujúce informácie o vykonávaní a interpretácii testovacej metódy B.1b.

Nie je potrebné podávať testované látky pri dávkach, o ktorých je známe, že spôsobujú silnú bolesť a utrpenie následkom leptavých alebo silne dráždivých účinkov. Moribundné zvieratá alebo zvieratá s bolesťami, alebo zvieratá, ktoré vykazujú príznaky silného a trvalého utrpenia, sa humánnym spôsobom usmrcujú a pri interpretácii výsledkov testu sa vyhodnocujú rovnako ako zvieratá, ktoré uhynuli pri teste. Kritériá na rozhodnutie usmrtiť moribundné alebo silne trpiace zvieratá a usmernenie o uznaní predvídateľnej alebo nastávajúcej smrti sú predmetom samostatného usmerňovacieho dokumentu (9).

Metóda využíva vopred stanovené dávky a výsledky umožňujú, aby sa látka mohla zatriediť a klasifikovať podľa Globálne harmonizovaného systému pre klasifikáciu chemikálií, ktoré spôsobujú akútnu toxicitu (10).

Metóda nie je v zásade určená na umožnenie výpočtu presnej hodnoty LD_{50}, ale umožňuje stanoviť definované rozsahy expozície, kde sa očakáva letalita, keďže uhynutie časti zvierat je stále najdôležitejším konečným bodom tohto testu. Metóda umožňuje stanoviť hodnoty LD_{50} iba v prípade, keď v dôsledku podania aspoň dvoch dávok je mortalita vyššia ako 0 % a nižšia ako 100 %. Výber vopred stanovených dávok bez ohľadu na testovanú látku s klasifikáciou výlučne viazanou na počet zvierat vyšetrovaných v rôznych stavoch zlepšuje možnosti konzistencie podávania správ a reprodukovateľnosti medzi laboratóriami.

▼B

Testovacie laboratórium posúdi všetky dostupné informácie o testovanej látke pred uskutočnením štúdie. Takéto informácie budú zahŕňať identitu a chemickú štruktúru látky, jej fyzikálno-chemické vlastnosti, výsledok všetkých ostatných *in vivo* alebo *in vitro* testov toxicity s látkou, toxikologické údaje o štrukturálne príbuzných látkach a predpokladané použitie(-ia) látky. Tieto informácie sú potrebné na ubezpečenie všetkých zainteresovaných, že test je dôležitý na ochranu zdravia ľudí a pomôže pri výbere najvhodnejšej počiatočnej dávky.

1.2. DEFINÍCIE

Akútna orálna toxicita: vzťahuje sa na tie nepriaznivé účinky, ktoré sa vyskytnú po orálnom podaní jednorazovej dávky látky alebo viacnásobných dávok podávaných v priebehu 24 hodín.

Oneskorená smrť: znamená, že zviera neuhynie ani sa nejaví ako moribundné v priebehu 48 hodín, ale uhynie neskôr v priebehu vymedzeného 14-dňového obdobia pozorovania.

Dávka: množstvo podanej testovanej látky. Dávka je vyjadrená ako hmotnosť testovanej látky na jednotku hmotnosti pokusného zvieraťa (napr. mg/kg).

GHS: Globálne harmonizovaný klasifikačný systém pre chemické látky a zmesi. Spoločný projekt OECD (zdravie ľudí a životné prostredie), Výboru expertov OSN pre prepravu nebezpečného tovaru (fyzikálno-chemické vlastnosti) a ILO (oznamovanie nebezpečenstva) a koordinovaný v rámci Interorganisation Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC).

Blížiaca sa smrť: keď sa očakáva moribundný stav pred ďalším plánovaným obdobím pozorovania. Príznaky, ktoré sú príznačné pre tento stav u hlodavcov by mohli zahŕňať kŕče, polohu na boku, polohu v ľahu a triašku. [Ďalšie informácie sa nachádzajú v Humane Endpoint Guidance Document (9).]

LD_{50} (stredná smrteľná orálna dávka): štatistický odvodená jednorazová dávka látky, pri ktorej sa dá očakávať, že spôsobí úhyn 50 % zvierat pri orálnom podaní. Hodnota LD_{50} je vyjadrená ako hmotnosť testovanej látky na jednotku hmotnosti pokusného zvieraťa (mg/kg).

Limitná dávka: sa vzťahuje na dávku nad hornou hranicou testovania (2 000 alebo 5 000 mg/kg).

Moribundný stav: stav umierania alebo neschopnosti prežiť, dokonca aj pri liečbe. [Ďalšie informácie sa nachádzajú v Humane Endpoint Guidance Document (9).]

Predvídateľná smrť: prítomnosť klinických príznakov charakteristických pre smrť v známom čase v budúcnosti pred plánovaným ukončením experimentu; napríklad neschopnosť prijímať vodu alebo jedlo. [Ďalšie informácie sa nachádzajú v Humane Endpoint Guidance Document (9).]

▼B

1.3. PRINCÍP TESTU

Princíp testu spočíva v tom, že na základe metódy postupných krokov s použitím minimálneho počtu zvierat na krok sa získajú dostatočné informácie o akútnej toxicite testovanej látky, ktoré umožnia jej klasifikáciu. Látka sa podáva orálne skupine pokusných zvierat v jednej zo stanovených dávok. Látka sa testuje s použitím metódy postupných krokov, v každom kroku sa použijú tri zvieratá rovnakého pohlavia (zvyčajne samice). Absencia alebo výskyt mortality súvisiacej s látkou u zvierat, ktorým sa podala dávka v jednom kroku, určí ďalší krok, t. j.:

— nie je potrebné ďalšie testovanie,

— podanie rovnakej dávky trom ďalším zvieratám,

— podanie najbližšej vyššej alebo najbližšej nižšej dávky trom ďalším zvieratám.

Informácie o postupe testu sú uvedené v prílohe 1. Metóda umožní posúdenie vzhľadom na klasifikáciu testovanej látky do jednej z viacerých tried toxicity definovaných pevnými hraničnými hodnotami LD_{50}.

1.4. OPIS METÓDY

1.4.1. **Výber druhu zvierat**

Spomedzi druhov hlodavcov sa prednostne používa potkan, hoci sa môže použiť aj iný druh hlodavca. Zvyčajne sa používajú samice (9). Je to preto, že prehľady konvenčných LD_{50} testov, uverejnené v odbornej literatúre, uvádzajú, že hoci je malý rozdiel v citlivosti medzi pohlaviami, v tých prípadoch, keď sa pozorovali rozdiely, sú samice zvyčajne mierne citlivejšie (11). Ak však z poznatkov o toxikologických alebo toxikokinetických vlastnostiach štrukturálne príbuzných chemikálií vyplýva, že samce môžu byť citlivejšie, potom sa použije toto pohlavie. Ak sa test uskutočňuje na samcoch, je potrebné uviesť primerané zdôvodnenie.

Používajú sa zdravé mladé dospelé zvieratá bežne používaných laboratórnych kmeňov. Samice majú byť panenské a negravidné. Každé zviera na začiatku dávkovania má byť vo veku od 8 do 12 týždňov a jeho hmotnosť má byť v rozpätí ± 20 % priemernej hmotnosti všetkých zvierat, ktorým sa predtým podala dávka.

1.4.2. **Podmienky umiestnenia a kŕmenia**

Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 °C (± 3 °C). Aj keď relatívna vlhkosť by mala byť aspoň 30 % a nemala by prevyšovať 70 %, okrem obdobia počas čistenia miestnosti by mala dosahovať 50 % – 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé, v rytme 12 hodín svetlo, 12 hodín tma. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Zvieratá môžu byť v klietkach po skupinách podľa dávok, ale počet zvierat na klietku musí umožniť zreteľné pozorovanie každého zvieraťa.

▼B

1.4.3. **Príprava zvierat**

Zvieratá sú náhodne vybrané, označené tak, aby sa umožnila jednotlivá identifikácia, a držia sa v klietkach aspoň 5 dní pred začiatkom podávania dávok, aby sa aklimatizovali na laboratórne podmienky.

1.4.4. **Príprava dávok**

Testované látky sa zvyčajne podávajú v stálom objeme počas celého intervalu dávkovania, ktoré sa má testovať na základe zmeny koncentrácie dávkovaného prípravku. Ak sa však má testovať kvapalný konečný produkt alebo zmes, použitie neriedenej testovanej látky, t. j. s konštantnou koncentráciou, môže byť pre následné stanovenie rizika tejto látky vhodnejšie a požadujú ho niektoré regulačné orgány. V každom prípade sa nesmie prekročiť maximálny objem podávanej dávky. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže jednorazovo podať, závisí od veľkosti pokusného zvieraťa. U hlodavcov by objem zvyčajne nemal presiahnuť 1 ml/100 g telesnej hmotnosti: v prípade vodných roztokov sa však môže uvažovať o 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Pokiaľ ide o zloženie dávkovaného prípravku, odporúča sa vždy, keď je to možné, použitie vodného roztoku/suspenzie/emulzie, za ktorým v poradí nasleduje roztok/-suspenzia/emulzia v oleji (napr. kukuričný olej), a potom prípadne roztok v iných nosičoch. Pre nosiče, ktoré sú iné ako voda, by mali byť známe toxikologické charakteristiky. Dávky musia byť pripravené tesne pred podávaním, pokiaľ nie je známa a prijateľná stabilita prípravku počas obdobia, keď sa bude používať.

1.5. POSTUP

1.5.1. **Podávanie dávok**

Testovaná látka sa podáva ako jednorazová dávka cez sondu s použitím žalúdočnej sondy alebo vhodnej intubačnej kanyly. Za nezvyčajných okolností, keď nie je možná jednorazová dávka, sa môže dávka podávať v menších množstvách v priebehu maximálne 24 hodín.

Zvieratá sa pred podávaním dávok vyhladujú (napr. potkanom sa cez noc zadrží potrava, ale nie voda; myšiam sa na 3 – 4 hodiny zadrží potrava, ale nie voda). Po období hladovania sa zvieratá odvážia a podá sa im testovaná látka. Po podaní látky sa zadrží potrava na ďalšie 3 – 4 hodiny potkanom alebo myšiam na 1 – 2 hodiny. Ak sa dávka podáva po častiach počas určitého obdobia, môže byť potrebné poskytnúť zvieratám potravu a vodu v závislosti od dĺžky obdobia.

1.5.2. **Počet zvierat a veľkosť dávok**

Na každý krok sa použijú tri zvieratá. Veľkosť dávky, ktorá sa použije ako počiatočná dávka, sa vyberie z jednej zo štyroch stabilných hodnôt 5, 50, 300 a 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti. Počiatočná dávka má byť taká, pri ktorej s najväčšou pravdepodobnosťou nastane smrť u niektorých zvierat, ktorým sa dávka podala. Postupové diagramy v prílohe 1 opisujú postup, ktorý je potrebné dodržiavať pre každú z počiatočných dávok. Pritom príloha 4 poskytuje usmernenie ku klasifikácii v schéme EÚ, až kým sa nezavedie nový GHS.

▼B

Keď z dostupných informácií vyplýva, že úmrtie je nepravdepodobné pri najvyššej počiatočnej dávke (2 000 mg/kg telesnej hmotnosti), potom je potrebné vykonať limitný test. Ak nie sú žiadne informácie o látke, ktorá sa má testovať, z dôvodu starostlivosti o zvieratá sa odporúča použiť počiatočnú dávku 300 mg/kg telesnej hmotnosti.

Časový interval medzi skupinami dávok je určený nástupom, trvaním a závažnosťou príznakov toxicity. Zvieratám sa podá ďalšia dávka až po ubezpečení, že zvieratá, ktorým sa predtým dávka podala, prežili.

Výnimočne, a iba v odôvodnených prípadoch na základe osobitných regulačných potrieb, sa môže uvažovať o použití ďalšej vyššej stabilnej dávky 5 000 mg/kg telesnej hmotnosti (pozri prílohu 2). Z dôvodu starostlivosti o zvieratá sa testy na zvieratách v rozsahu GHS kategórie 5 (2 000 – 5 000 mg/kg) neodporúčajú a uvažuje sa o nich iba v prípade veľkej pravdepodobnosti, že výsledky takéhoto testu by mohli byť bezprostredne dôležité pre ochranu zdravia ľudí a zvierat alebo ochranu životného prostredia.

1.5.3. **Limitný test**

Limitný test sa používa predovšetkým v situáciách, keď experimentátor má informácie, z ktorých vyplýva, že testovaný materiál je pravdepodobne netoxický, t. j. že je toxický iba v prípade, keď prevyšuje predpismi stanovené limitné dávky. Informácie o toxicite testovaného materiálu možno získať z poznatkov o podobných testovaných látkach alebo podobne testovaných zmesiach alebo produktoch pri zohľadnení identity a percenta zložiek, o ktorých je známe, že sú toxikologicky významné. V týchto situáciách, keď existuje málo informácií alebo neexistujú žiadne informácie o jeho toxicite, alebo v ktorých sa očakáva, že testovaný materiál bude toxický, je potrebné vykonať základný test.

Limitný test s jednou dávkou 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti sa môže vykonať so šiestimi zvieratami (tri zvieratá na každý krok). Výnimočne sa môže vykonať limitný test s jednou dávkou 5 000 mg/kg s tromi zvieratami (pozri prílohu 2). Ak sa vyskytne uhynutie súvisiace s testovanou látkou, môže byť potrebné vykonať ďalšie testovanie s najbližšou nižšou dávkou.

1.6. POZOROVANIA

Zvieratá sa pozorujú individuálne po podaní dávky aspoň raz počas prvých 30 minút, pravidelne počas prvých 24 hodín, osobitne pozorne počas prvých 4 hodín a potom každý deň počas celkove 14 dní okrem prípadu, keď je potrebné zvieratá vylúčiť zo štúdie a z dôvodu starostlivosti o zvieratá humánnym spôsobom usmrtiť alebo keď sa zistí, že uhynuli. Dĺžka pozorovania by sa však nemala pevne stanoviť. Stanoví sa na základe toxických reakcií, času nástupu a dĺžky času zotavenia, a teda sa môže predĺžiť, ak sa to pokladá za potrebné. Časy, keď sa objavia a zmiznú príznaky toxicity, sú dôležité predovšetkým v prípade tendencie oneskorenia toxických príznakov (12). Všetky pozorovania sa systematicky zaznamenávajú, pričom každé zviera má individuálny záznam.

▼B

Ďalšie pozorovania budú potrebné, ak zvieratá naďalej vykazujú príznaky toxicity. Pri vyšetreniach sa venuje pozornosť zmenám na pokožke a srsti, očiach a slizniciach a tiež respiračnému, obehovému, autonómnemu a centrálnemu nervovému systému a somatomotorickej aktivite a spôsobu správania. Pozornosť sa zameriava na pozorovanie triašky, kŕčov, slinenia, hnačky, letargie, spánku a kómy. Zohľadňujú sa aj zásady a kritériá zosumarizované v Humane Endpoints Guidance Document (9). Zvieratá, ktoré sú v moribundnom stave alebo vykazujú silné bolesti alebo pretrvávajúce príznaky silného utrpenia, sa humánnym spôsobom usmrtia. Keď sa zvieratá usmrtia z humánnych dôvodov alebo sa nájdu uhynuté, je potrebné čo možno najpresnejšie zaznamenať čas uhynutia.

1.6.1. **Telesná hmotnosť**

Hmotnosť jednotlivých zvierat sa stanovuje krátko pred podaním testovanej látky a potom aspoň každý týždeň. Zmeny hmotnosti sa vypočítajú a zaznamenajú. Na konci testu sa zvieratá, ktoré prežili, odvážia a humánnym spôsobom usmrtia.

1.6.2. **Patológia**

Všetky testované zvieratá (vrátane tých, ktoré uhynú počas testu alebo sú vylúčené zo štúdie z dôvodu starostlivosti o zvieratá) sa podrobujú autopsii. Všetky makroskopické patologické zmeny u každého zvieraťa sa zaznamenávajú. Môže sa tiež uvažovať o vykonaní mikroskopického vyšetrenia orgánov, dokazujúceho makropatologické nálezy vo zvieratách, ktoré prežili 24 alebo viac hodín, ktoré môže poskytnúť užitočné informácie.

2. **ÚDAJE**

O jednotlivých zvieratách sa uvádzajú informácie. Okrem toho sa všetky údaje zhrnú v podobe tabuliek, kde sa uvedie pre každú pokusnú skupinu počet použitých zvierat, počet zvierat vykazujúcich príznaky toxicity, počet zvierat, ktoré sa našli uhynuté počas testu alebo ich usmrtili z humánnych dôvodov, čas uhynutia jednotlivých zvierat, opis a časový priebeh toxických účinkov a reverzibility a pitevné nálezy.

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

3.1. **Správa o teste**

Správa o teste musí podľa potreby obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

— fyzikálny charakter, čistota a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti (vrátane izomerizácie),

— identifikačné údaje vrátane čísla CAS.

Nosič (v prípade potreby):

— zdôvodnenie výberu nosiča, ak je iný ako voda.

Pokusné zvieratá:

— použitý druh/kmeň,

▼B

— mikrobiologický stav zvierat, ak je známy,

— počet, vek a pohlavie zvierat (vrátane zdôvodnenia na použitie samcov namiesto samíc, ak je potrebné),

— zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo atď.

Testovacie podmienky:

— údaje o zložení testovanej látky vrátane údajov o fyzikálnej forme podávaného materiálu,

— údaje o podávaní testovanej látky vrátane objemov dávok a čase podávania,

— údaje o kvalite krmiva a vody (vrátane druhu krmiva/zdroja, zdroja vody),

— zdôvodnenie výberu počiatočnej dávky.

Výsledky:

— tabuľkové spracovanie získaných údajov o reakcii a veľkosti dávky pre každé zviera (t. j. zvieratá vykazujúce príznaky toxicity vrátane mortality, charakteru, závažnosti a trvania účinkov),

— tabuľkové spracovanie telesnej hmotnosti a zmien telesnej hmotnosti,

— hmotnosti jednotlivých zvierat v deň podávania dávok, potom v týždňových intervaloch a v čase uhynutia alebo usmrtenia,

— dátum a čas uhynutia v prípade vopred naplánovaného usmrtenia,

— časový priebeh nástupu príznakov toxicity a či tieto príznaky boli reverzibilné pre každé zviera,

— pitevné nálezy a histopatologické nálezy pre každé zviera, ak sú k dispozícii.

Diskusia a interpretácia výsledkov.

Závery.

4. **ODKAZY**

(1) Roll R., Höfer-Bosse Th. and Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. Toxicol. Lett., Suppl. 31, 86.

(2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. Bundesgesundheitsblatt 32, 336 – 341.

(3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 68, 559 – 610.

(4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 729 – 734.

(5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC_{50} Tests. ALTEX 16, 129 – 134.

(6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method – An Alternative to the LD50 Test. Arch. Toxicol. 66, 455 – 470.

▼B

(7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). Arch. Toxicol. 69, 659 – 670.

(8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

(9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.

(10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html].

(11) Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel K A, Walker A P, Chu I; Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD_{50}, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. Fd. Chem. Toxicol 33, 223 – 231.

(12) Chan P.K. and A.W. Hayes (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

▼B

Príloha 1

POSTUP, KTORÝ JE POTREBNÉ DODRŽIAVAŤ PRE KAŽDÚ POČIATOČNÚ DÁVKU

VŠEOBECNÉ POZNÁMKY

Pre každú počiatočnú dávku príslušné testovacie schémy, ako je uvedené v tejto prílohe, uvádzajú postup, ktorý je potrebné dodržiavať.

— príloha 1 A: počiatočná dávka je 5 mg/kg telesnej hmotnosti,

— príloha 1 B: počiatočná dávka je 50 mg/kg telesnej hmotnosti,

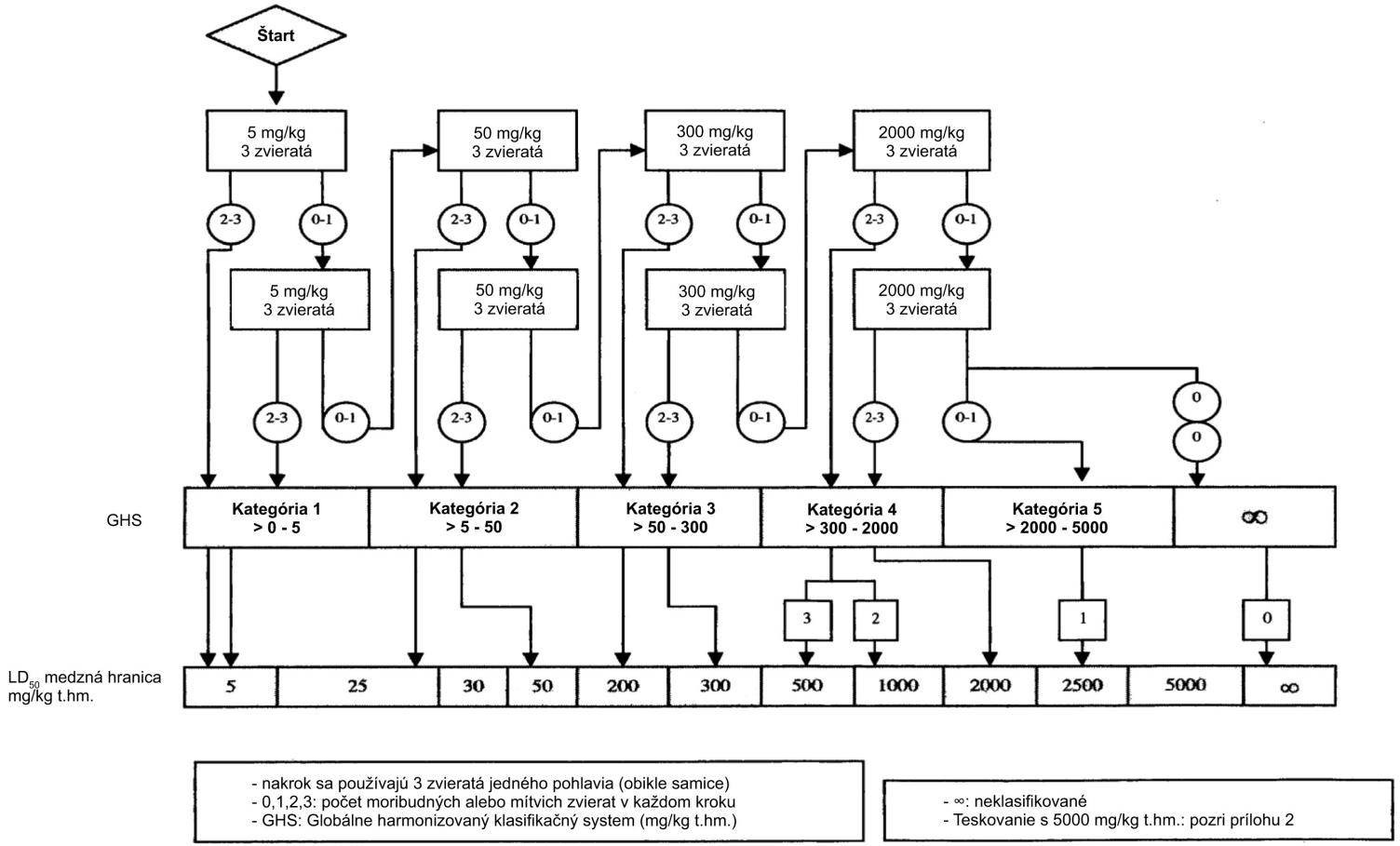
— príloha 1 C: počiatočná dávka je: 300 mg/kg telesnej hmotnosti,

— príloha 1 D: počiatočná dávka je: 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti.

V závislosti od počtu zvierat usmrtených humánnym spôsobom alebo uhynutých sa postup testovania uskutočňuje podľa naznačených šípok.

Príloha 1 A

POSTUP TESTOVANIA S POČIATOČNOU DÁVKOU 5 MG/KG TELESNEJ HMOTNOSTI

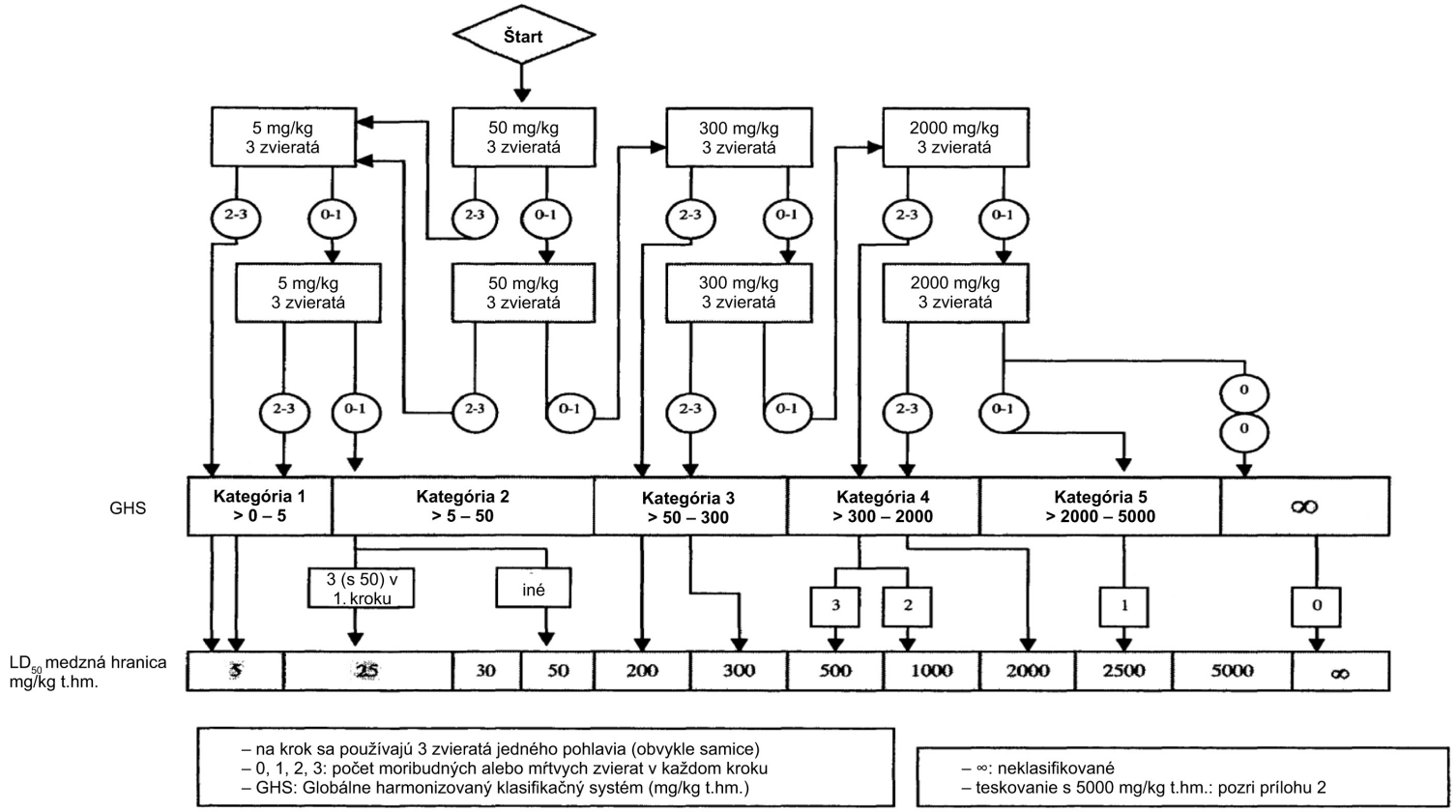


- nakrok sa používajú 3 zvieratá jedného pohlavia (obikle samice)
- 0,1,2,3: počet moribudných alebo mítvich zvierat v každom kroku
- GHS: Globálne harmonizovaný klasifikačný system (mg/kg t.hm.)

- ∞: neklasifikované
- Teskovanie s 5000 mg/kg t.hm.: pozri prílohu 2

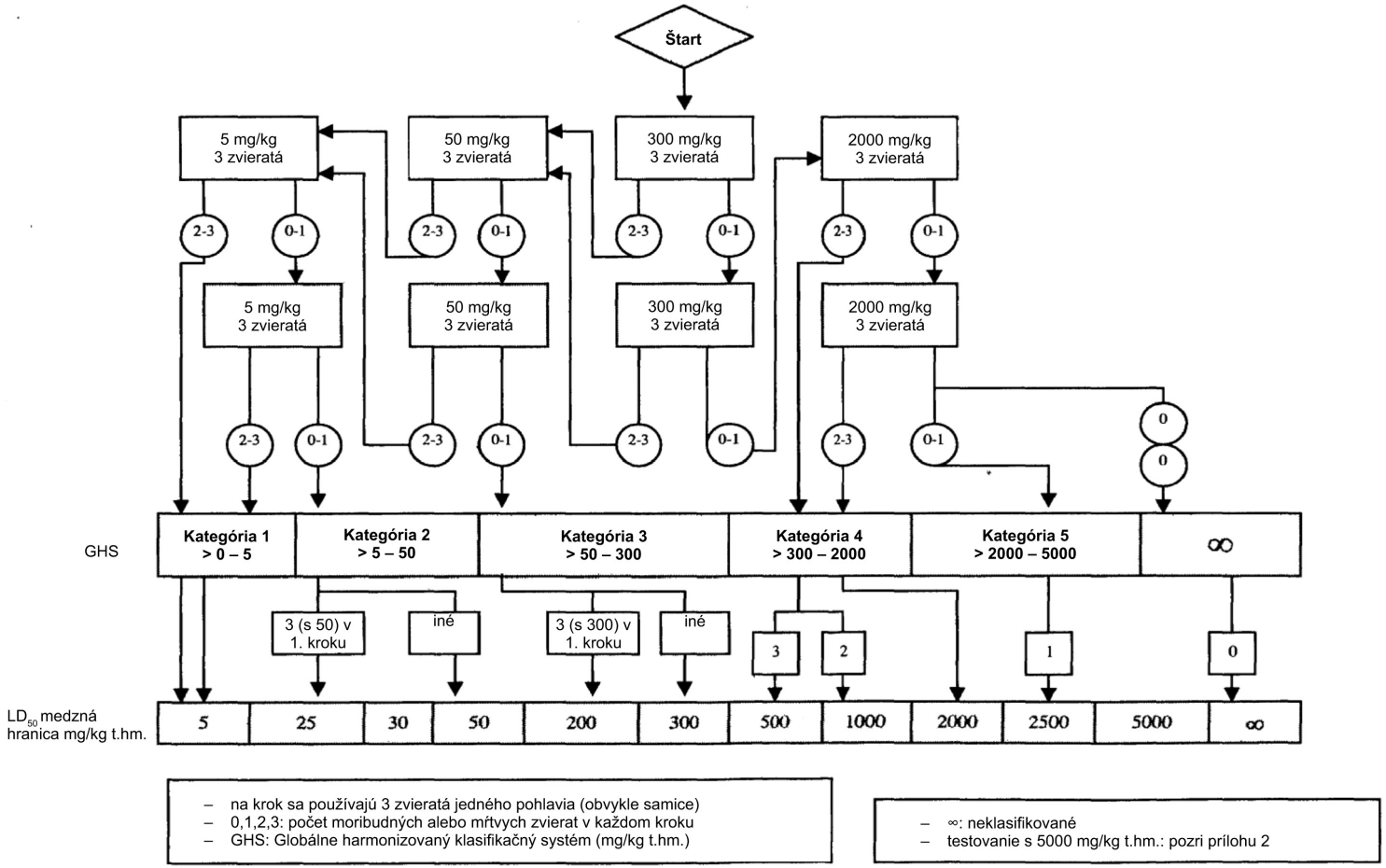
Príloha 1 B

POSTUP TESTOVANIA S POČIATOČNOU DÁVKOU 50 MG/KG TELESNEJ HMOTNOSTI



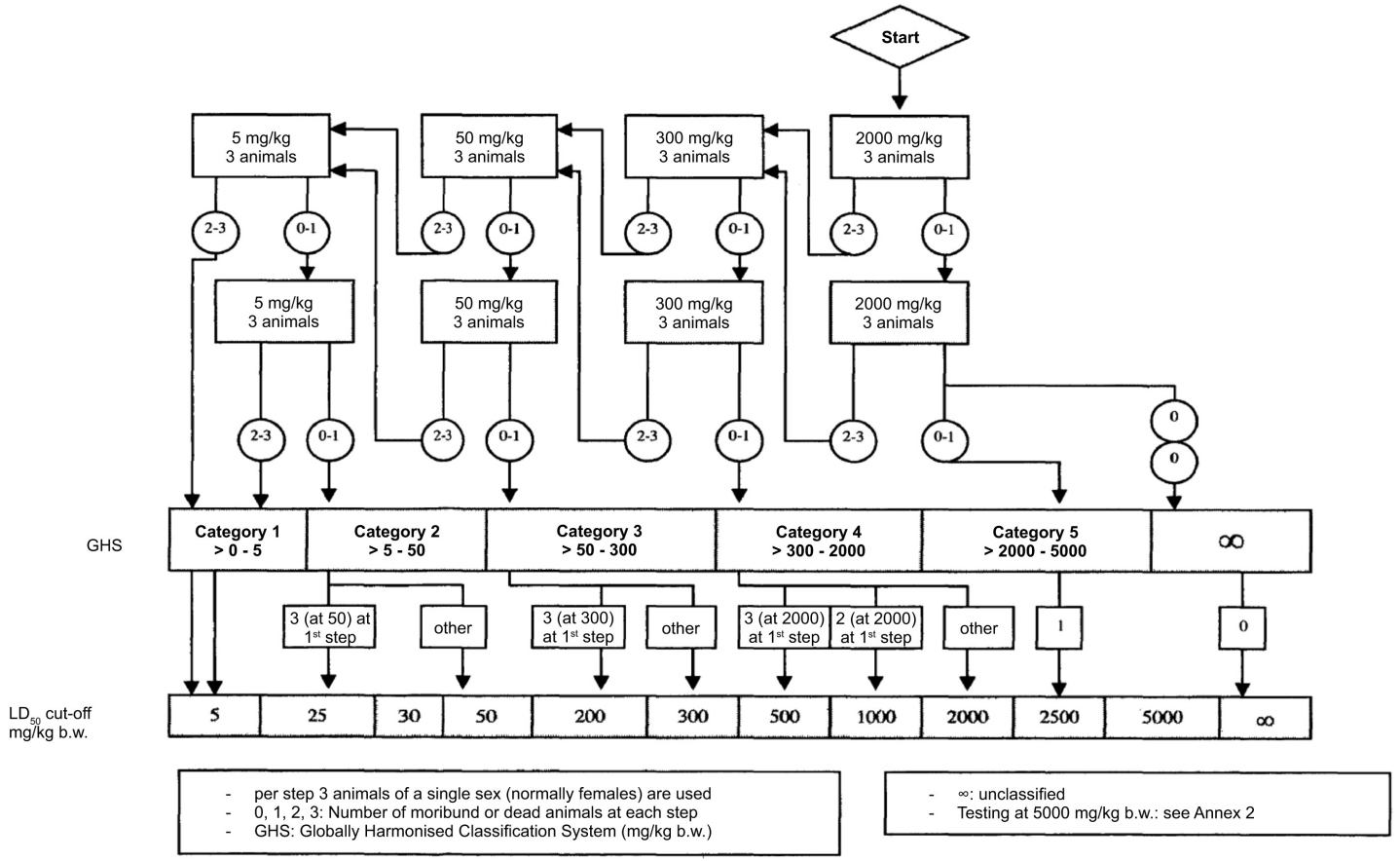
Príloha 1 C

POSTUP TESTOVANIA S POČIATOČNOU DÁVKOU 300 MG/KG TELESNEJ HMOTNOSTI



Príloha 1 D

POSTUP TESTOVANIA S POČIATOČNOU DÁVKOU 2 000 MG/KG TELESNEJ HMOTNOSTI



▼B

Príloha 2

KRITÉRIÁ PRE KLASIFIKÁCIU TESTOVANÝCH LÁTOK S OČAKÁVANÝMI HODNOTAMI LD_{50} VYŠŠÍMI AKO 2 000 MG/KG, KTORÉ NIE JE POTREBNÉ TESTOVAŤ

Kritériá pre kategóriu nebezpečenstva 5 sú určené na to, aby sa umožnila identifikácia testovaných látok s relatívne nízkym nebezpečenstvom akútnej toxicity, ale ktoré za určitých podmienok môžu predstavovať nebezpečenstvo pre zraniteľnejšie skupiny obyvateľstva. Predpokladá sa, že tieto látky majú orálnu alebo dermálnu LD_{50} v rozsahu 2 000 – 5 000 mg/kg alebo rovnocennú s dávkami pre iné cesty podávania. Testované látky sa klasifikujú do kategórie nebezpečenstva, ktorá je definovaná ako: 2 000 mg/kg < LD_{50} < 5 000 mg/kg (kategória 5 v GHS) v týchto prípadoch:

a) ak sú zaradené do tejto kategórie na základe niektorej z testovacích schém v prílohe 1a – 1d založených na prípadoch úmrtia;

b) ak je už dostupný spoľahlivý dôkaz, z ktorého vyplýva, že LD_{50} je v rozsahu hodnôt kategórie 5; alebo z iných štúdií na zvieratách alebo toxických účinkoch u ľudí vyplývajú akútne dôsledky pre zdravie ľudí.

c) pomocou extrapolácie, odhadu a merania údajov, ak nie je potvrdené zaradenie do vyššej triedy nebezpečenstva, a

   — sú k dispozícii dostupné spoľahlivé informácie, z ktorých vyplývajú závažné toxické účinky u ľudí, alebo

   — vyskytla sa mortalita pri testovaní s orálnym podávaním dávok až do hodnôt kategórie 4, alebo

   — ak odborné posúdenie potvrdí závažné klinické príznaky toxicity pri testovaní až do hodnôt kategórie 4, okrem hnačky, zježenia alebo neupraveného vzhľadu, alebo

   — ak odborné posúdenie potvrdí spoľahlivé informácie, z ktorých vyplývajú na základe iných štúdií na zvieratách možné závažné akútne účinky.

TESTOVANIE S DÁVKAMI NAD 2 000 MG/KG

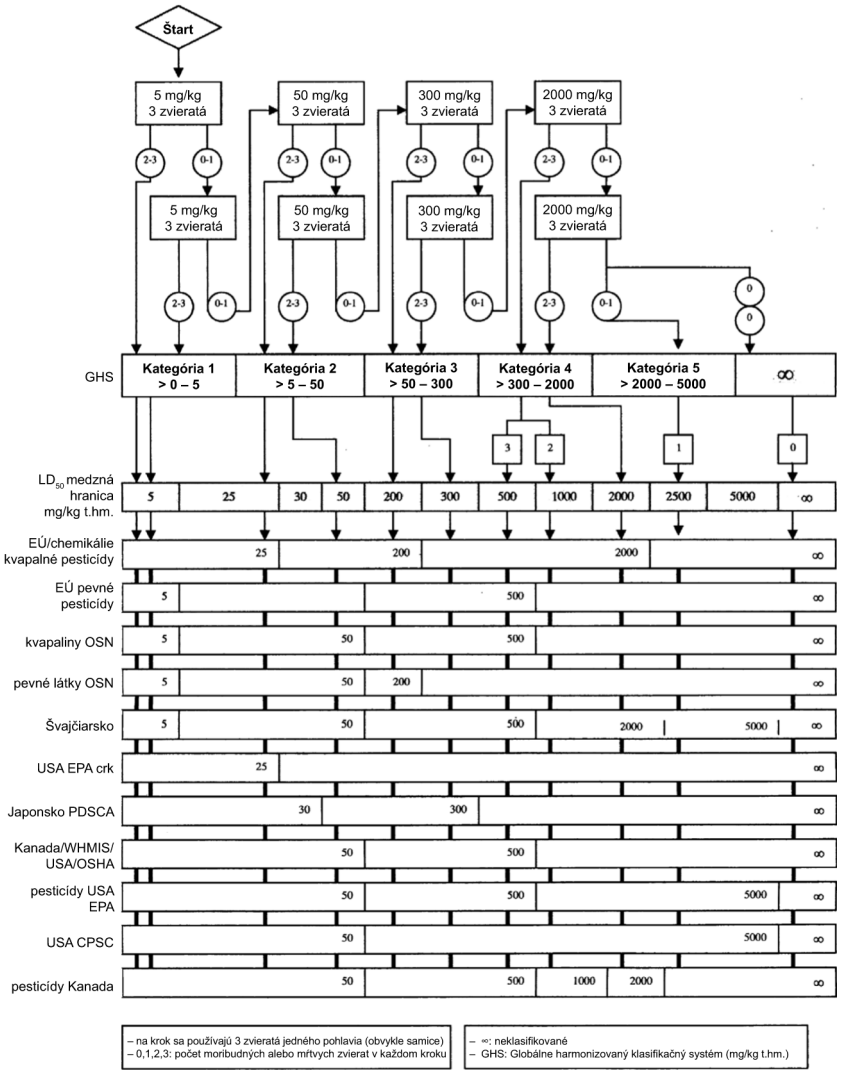
Vzhľadom na potrebu ochrany zvierat sa testovanie zvierat v rozsahoch kategórie 5 (5 000 mg/kg) neodporúča a môže sa o jeho použití uvažovať iba v prípade veľkej pravdepodobnosti, že by výsledky takéhoto testu mohli byť bezprostredne dôležité pre ochranu zdravia ľudí a zvierat (10). Nie je potrebné uskutočniť ďalšie testovanie s vyššími dávkami.

Ak sa pre testovanie vyžaduje dávka 5 000 mg/kg, je potrebný iba jeden krok (t. j. tri zvieratá). Ak zviera, ktorému sa najskôr podala dávka, uhynie, potom podávanie dávok pokračuje s dávkou 2 000 mg/kg v súlade s postupovými diagramami v prílohe 1. Ak prvé zviera prežije, dvom ďalším sa podajú dávky. Ak uhynie iba jedno z troch zvierat, očakáva sa, že hodnota LD_{50} bude vyššia ako 5 000 mg/kg. Ak obe zvieratá uhynú, potom sa podajú dávky s veľkosťou 2 000 mg/kg.

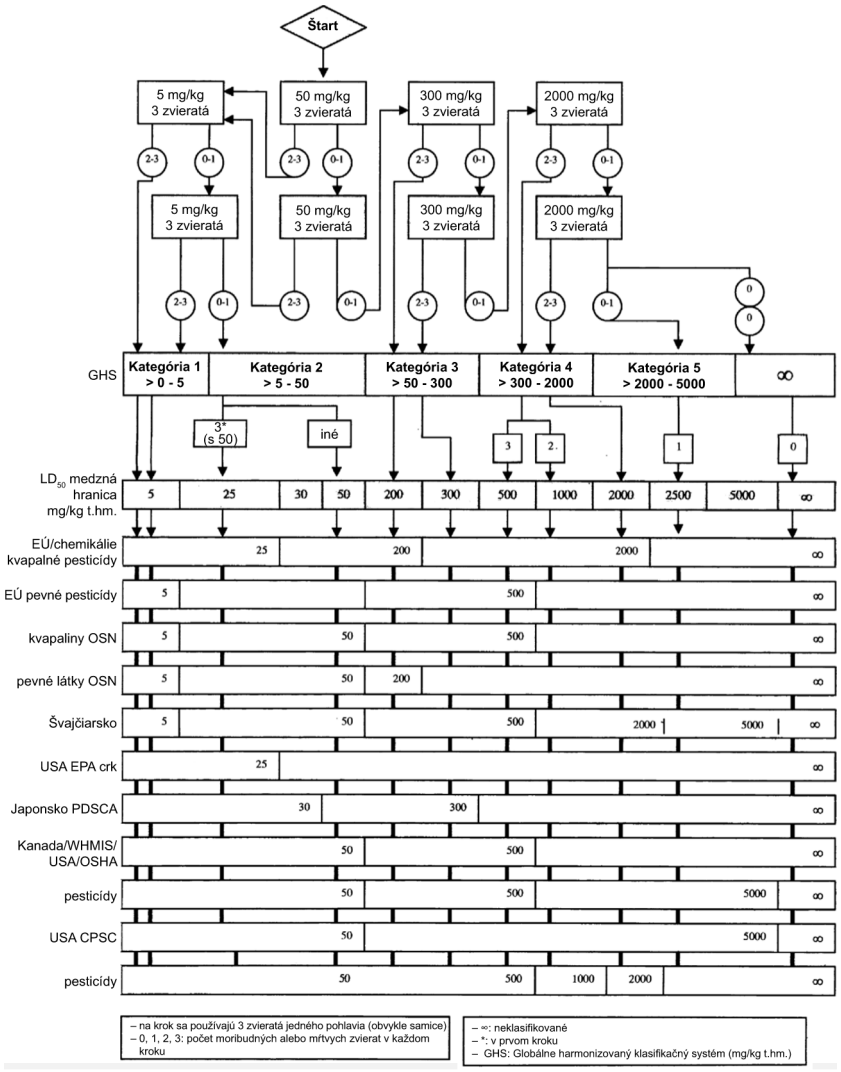
▼B

Príloha 3

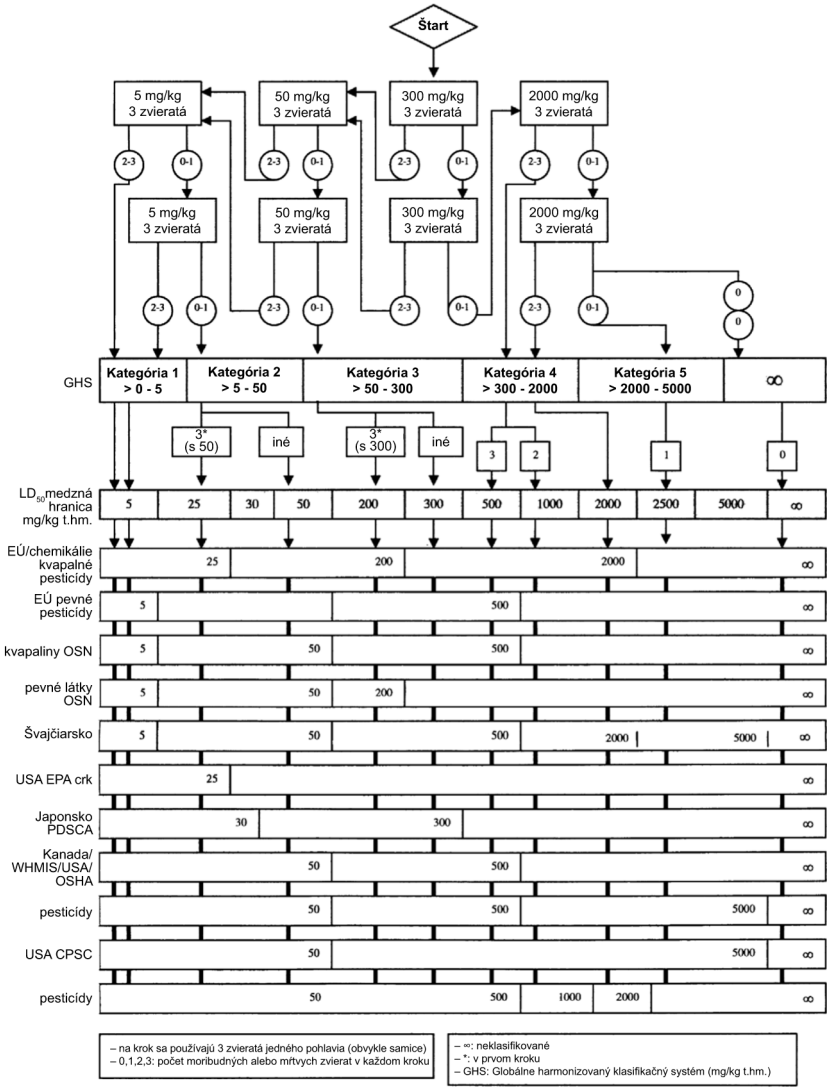
TESTOVACIA METÓDA B.1 tris: Usmernenie pre klasifikáciu podľa schémy EÚ na prekonanie prechodného obdobia až do úplného zavedenia Globálne harmonizovaného klasifikačného systém (GHS) [prevzaté z odkazu (8)]



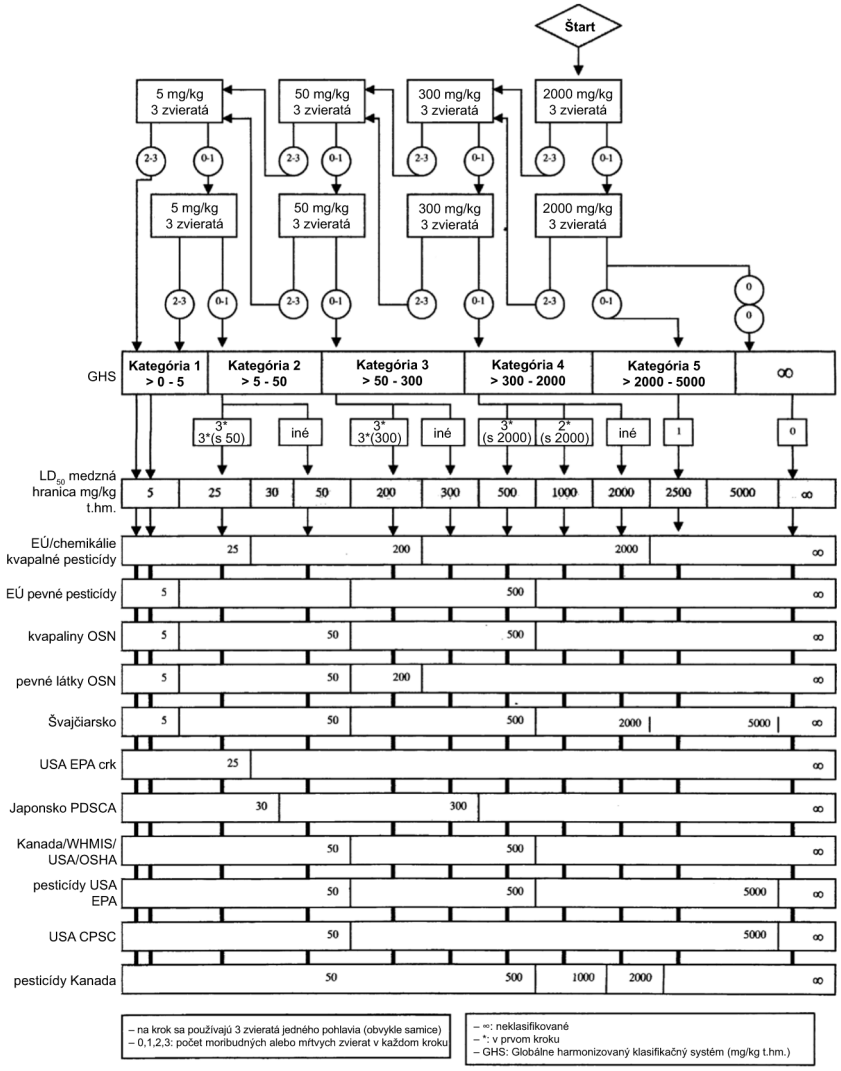
▼B


Štart
5 mg/kg 3 zvieratá
50 mg/kg 3 zvieratá
300 mg/kg 3 zvieratá
2000 mg/kg 3 zvieratá
2-3
0-1
0
GHS
Kategória 1 > 0 - 5
Kategória 2 > 5 - 50
Kategória 3 > 50 - 300
Kategória 4 > 300 - 2000
Kategória 5 > 2000 - 5000
∞
3* (s 50)
iné
LD50 medzná hranica mg/kg t.hm.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EÚ/chemikálie kvapalné pesticídy
EÚ pevné pesticídy
kvapaliny OSN
pevné látky OSN
Švajčiarsko
USA EPA crk
Japonsko PDSCA
Kanada/WHMIS/ USA/OSHA
pesticídy
USA CPSC
pesticídy
– na krok sa používajú 3 zvieratá jedného pohlavia (obvykle samice)
– 0, 1, 2, 3: počet moribudných alebo mŕtvych zvierat v každom kroku
– ∞: neklasifikované
– *: v prvom kroku
– GHS: Globálne harmonizovaný klasifikačný systém (mg/kg t.hm.)

▼B


Štart
5 mg/kg 3 zvieratá
50 mg/kg 3 zvieratá
300 mg/kg 3 zvieratá
2000 mg/kg 3 zvieratá
2-3
0-1
0
GHS
Kategória 1 > 0 - 5
Kategória 2 > 5 - 50
Kategória 3 > 50 - 300
Kategória 4 > 300 - 2000
Kategória 5 > 2000 - 5000
∞
3* (s 50)
iné
3* (s 300)
3
2
1
LD50 medzná hranica mg/kg t.hm.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EÚ/chemikálie kvapalné pesticídy
EÚ pevné pesticídy
kvapaliny OSN
pevné látky OSN
Švajčiarsko
USA EPA crk
Japonsko PDSCA
Kanada/ WHMIS/USA/ OSHA
pesticídy
USA CPSC
pesticídy
– na krok sa používajú 3 zvieratá jedného pohlavia (obvykle samice)
– 0,1,2,3: počet moribudných alebo mŕtvych zvierat v každom kroku
– ∞: neklasifikované
– *: v prvom kroku
– GHS: Globálne harmonizovaný klasifikačný systém (mg/kg t.hm.)

▼B


Štart
5 mg/kg 3 zvieratá
50 mg/kg 3 zvieratá
300 mg/kg 3 zvieratá
2000 mg/kg 3 zvieratá
2-3
0-1
0
GHS
Kategória 1 > 0 - 5
Kategória 2 > 5 - 50
Kategória 3 > 50 - 300
Kategória 4 > 300 - 2000
Kategória 5 > 2000 - 5000
∞
3* 3*(s 50)
iné
3* 3*(300)
3* (s 2000)
2* (s 2000)
1
LD50 medzná hranica mg/kg t.hm.
5 25 30 50 200 300 500 1000 2000 2500 5000 ∞
EÚ/chemikálie kvapalné pesticídy
EÚ pevné pesticídy
kvapaliny OSN
pevné látky OSN
Švajčiarsko
USA EPA crk
Japonsko PDSCA
Kanada/WHMIS/ USA/OSHA
pesticídy USA EPA
USA CPSC
pesticídy Kanada
– na krok sa používajú 3 zvieratá jedného pohlavia (obvykle samice)
– 0,1,2,3: počet moribudných alebo mŕtvych zvierat v každom kroku
– ∞: neklasifikované
– *: v prvom kroku
– GHS: Globálne harmonizovaný klasifikačný systém (mg/kg t.hm.)

▼M4

B.2. AKÚTNA INHALAČNÁ TOXICITA

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s Usmerneniami OECD na vykonávanie testov TG 403 (2009) (1). Pôvodné Usmernenia na vykonávanie testov akútnej inhalácie 403 (TG 403) boli prijaté v roku 1981. Táto revidovaná testovacia metóda B.2 (ako rovnocenná verzia revidovaných usmernení TG 403) bola vytvorená s cieľom zabezpečiť väčšiu flexibilitu, znížiť využívanie zvierat a vyhovieť regulačným potrebám. Revidovaná testovacia metóda zahŕňa dva druhy štúdií: tradičný protokol LC_{50} a protokol koncentrácia × čas (C × t). Základnými črtami tejto testovacej metódy sú schopnosť určiť závislosť koncentrácie a reakcie v rozsahu od neletálnych dôsledkov až po smrteľné dôsledky na účely odvodenia strednej smrteľnej koncentrácie (LC_{50}), neletálnej prahovej koncentrácie (napr. LC01) a sklonu a zistenia potenciálnej vnímavosti pohlaví. Protokol C × t by sa mal použiť v prípade, že existuje konkrétna regulačná alebo vedecká potreba, ktorá vyžaduje testovanie na zvieratách v priebehu viacerých časových intervalov, ako napríklad na účely plánovania núdzovej reakcie [napr. odvodenie hodnôt smerodajných úrovní akútnej expozície (AEGL), usmernení pre plánovanie núdzovej reakcie (ERPG) alebo prahových úrovní akútnej expozície (AETL)] alebo na plánovanie využitia krajiny.

2. Usmernenia k vykonaniu a interpretácii štúdií tejto testovacej metódy sú k dispozícii v usmerňovacom dokumente o testovaní akútnej inhalačnej toxicity (GD 39) (2).

3. Vymedzenie pojmov použitých v súvislosti s touto testovacou metódou je uvedené na konci tejto kapitoly a v dokumente GD 39 (2).

4. Táto testovacia metóda umožňuje charakterizáciu testovanej chemikálie a kvantitatívne posúdenie rizík a umožňuje, aby boli testované chemikálie zoradené a klasifikované podľa nariadenia (ES) č. 1272/2008 (3). V dokumente GD 39 (2) sa uvádzajú usmernenia k výberu vhodnej metódy testovania akútnej toxicity. Ak sa požadujú iba informácie o klasifikácii a označovaní, vo všeobecnosti sa odporúča riadiť sa kapitolou B.52 tejto prílohy (4) [pozri dokument GD 39 (2)]. Táto testovacia metóda B.2 nie je špecificky určená na testovanie špecializovaných materiálov, ako sú slabo rozpustné izometrické alebo vláknité materiály alebo priemyselne vyrábané nanomateriály.

ÚVODNÉ ÚVAHY

5. Pred zvažovaním testovania podľa tejto testovacej metódy by testovacie laboratórium malo zohľadniť všetky dostupné informácie o testovanej chemikálii vrátane existujúcich štúdií [napr. kapitola B.52 tejto prílohy (4)] obsahujúcich údaje, na základe ktorých sa ďalšie testovanie neodporúča s cieľom minimalizovať využívanie zvierat. Informácie, ktoré môžu pomôcť pri výbere najvhodnejšieho druhu, kmeňa, pohlavia, spôsobu expozície a primeraných testovacích koncentrácií, zahŕňajú identitu, chemickú štruktúru a fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej chemikálie, výsledky všetkých testov toxicity *in vitro* alebo *in vivo*, predpokladané použitia a potenciál expozície človeka, dostupné údaje (Q)SAR a toxikologické údaje o štrukturálne príbuzných látkach [pozri dokument GD 39 (2)].

▼M4

6. Testovaniu žieravých a/alebo dráždivých testovacích chemikálií v koncentráciách, ktoré podľa očakávania spôsobia silnú bolesť a/alebo utrpenie by sa malo v čo najväčšej možnej miere vyhnúť. Žieravý/dráždivý potenciál by sa mal posúdiť prostredníctvom odborného posudku s využitím takých dôkazov, ako sú skúseností u ľudí a pri zvieratách (napr. zo štúdií opakovaných dávok uskutočnených pri nežieravých/dráždivých koncentráciách), existujúce údaje *in vitro* [napr. z kapitol B.40, (5), B.40a (6) tejto prílohy alebo dokumentu OECD TG 435 (7)], hodnoty pH, informácie o podobných látkach alebo akékoľvek iné súvisiace údaje, s cieľom preskúmať, či je možné vyhnúť sa ďalšiemu testovaniu. Na špecifické regulačné účely (napr. na účely núdzového plánovania) možno túto testovaciu metódu použiť na expozíciu zvierat týmto materiálom, lebo to poskytne vedúcemu štúdie alebo vedúcemu výskumnému pracovníkovi kontrolu nad výberom cieľových koncentrácií. Cieľové koncentrácie by však nemali spôsobovať silné dráždivé/žieravé účinky, mali by však byť dostatočné na predĺženie krivky závislosti reakcie od koncentrácie na úroveň, na ktorej sa zabezpečí regulačný a vedecký cieľ testu. Tieto koncentrácie by sa mali vyberať v závislosti od jednotlivých prípadov a výber koncentrácie by sa mal odôvodniť [pozri dokument GD 39 (2)].

PRINCÍP TESTU

7. Táto revidovaná testovacia metóda B.2 bola vypracovaná s cieľom získať dostatočné informácie o akútnej toxicite testovanej chemikálie, aby bolo možné ju klasifikovať a aby sa získali údaje o letalite (napr. LC_{50}, LC_{01} a sklon) v prípade jedného alebo oboch pohlaví potrebné na kvantitatívne posúdenie rizík. V rámci tejto testovacej metódy sú k dispozícii dve metódy. Prvou metódou je tradičný protokol, pri ktorom sú skupiny zvierat vystavené limitnej koncentrácii (limitný test) alebo sérii koncentrácií v rámci postupu niekoľkých krokov väčšinou v intervaloch trvajúcich štyri hodiny, ktoré sa určia vopred. Na špecifické regulačné účely možno použiť iné intervaly expozície. Druhou metódou je protokol ($C \times t$), pri ktorom sú skupiny zvierat vystavené jednej koncentrácii (limitná koncentrácia) alebo sérii viacerých koncentrácií v priebehu viacerých intervalov.

8. Moribundné zvieratá alebo zvieratá so zjavnými bolesťami alebo zvieratá, ktoré vykazujú príznaky silného a trvalého utrpenia, by sa mali humánnym spôsobom usmrtiť, pričom pri interpretácii výsledku testu sa vyhodnocujú rovnako ako zvieratá, ktoré uhynuli pri teste. Kritériá na rozhodnutie usmrtiť moribundné alebo silne trpiace zvieratá a usmernenie o uznaní predvídateľnej alebo nastávajúcej smrti sú predmetom usmerňovacieho dokumentu OECD č. 19 o humánnych parametroch (Humane Endpoints Guidance Document) (8).

OPIS METÓDY

Výber druhov zvierat

9. Používajú sa zdravé mladé dospelé zvieratá bežne používaných laboratórnych kmeňov. Najvhodnejším zvieraťom je potkan. Použitie iných druhov zvierat je nutné odôvodniť.

Príprava zvierat

10. Používajú sa samice, ktoré nikdy nevrhli mláďatá a sú negravidné. V deň expozície by zvieratá mali byť mladé dospelé jedince vo veku od 8 do 12 týždňov a ich telesná hmotnosť by mala byť v rozmedzí ± 20 % strednej hmotnosti jednotlivých pohlaví všetkých zvierat toho istého veku, ktoré boli exponované skôr. Zvieratá sa vyberajú náhodne a označia sa na účely individuálnej identifikácie. Zvieratá sa umiestnia do klietok najmenej na päť dní pred začatím testu, aby sa aklimatizovali na laboratórne podmienky. Zvieratá by sa na krátky čas pred testovaním mali aklimatizovať aj na testovacie zariadenie, lebo sa tak zníži stres spôsobený uvedením do nového prostredia.

▼M4

Chov zvierat

11. Teplota miestnosti, kde sa pokusné zviera chová, by mala byť 22 ± 3 °C. Relatívna vlhkosť by sa v ideálnom prípade mala udržiavať v rozsahu od 30 do 70 %, hoci to nemusí byť možné, ak sa ako nosič používa voda. Pred a po expozícii sú zvieratá zvyčajne umiestnené v klietkach v skupinách podľa pohlavia a koncentrácie, ale počet zvierat v jednej klietke by nemal prekážať bezproblémovému pozorovaniu každého zvieraťa, pričom by sa mali minimalizovať straty súvisiace so vzájomným požieraním alebo bojom jedincov. V prípade, že sa použije iba expozícia oblasti nosa, môže byť potrebné, aby sa zvieratá aklimatizovali na skúmavky obmedzujúce pohyb. Skúmavky by nemali zvieratám spôsobovať neprimeraný stres súvisiaci s fyzikálnymi vlastnosťami, teplotou alebo obmedzením pohybu. Obmedzenie môže mať vplyv na fyziologické sledované parametre, ako sú telesná teplota (hypertermia) a/alebo respiračný minútový objem. Ak sú k dispozícii všeobecné údaje, podľa ktorých k takýmto zmenám nedochádza vo veľkej miere, potom nie je potrebné predchádzajúce prispôsobenie obmedzujúcim skúmavkám. Zvieratá vystavené účinkom aerosólu celým telom by sa mali v priebehu expozície umiestniť samostatne, aby sa zabránilo filtrovaniu testovaného aerosólu cez srsť ostatných zvierat v klietke. S výnimkou času trvania expozície sa na kŕmenie môže používať bežné a osvedčené laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou miestnej pitnej vody. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy.

Inhalačné komory

12. Pri výbere inhalačnej komory by sa mal vziať do úvahy charakter testovanej chemikálie a cieľ testu. Uprednostňuje sa expozícia oblasti nosa (pričom tento pojem zahŕňa expozíciu hlavy, nosa alebo pysku). Vo všeobecnosti sa pri štúdiách kvapalných alebo tuhých aerosólov a pár, ktoré môžu kondenzovať a vytvárať aerosóly, uprednostňuje expozícia oblasti nosa. Špeciálne ciele štúdie možno lepšie dosiahnuť použitím expozície celého tela, ale tento krok je potrebné v správe o štúdii odôvodniť. Na zabezpečenie stability prostredia pri používaní komory na expozíciu celého tela by celkový objem testovaných zvierat nemal presiahnuť 5 % objemu komory. Princípy metód expozície celého tela a oblasti nosa a ich konkrétne výhody a nevýhody sú opísané v dokumente GD 39 (2).

PODMIENKY EXPOZÍCIE

Podávanie koncentrácií

13. Expozícia oblasti nosa môže mať pri potkanoch akékoľvek trvanie až do šiestich hodín. Ak sa použije expozícia oblasti nosa pri myšiach, vo všeobecnosti by nemala trvať dlhšie ako štyri hodiny. Ak je potrebné, aby expozícia trvala dlhšie, je nutné uviesť odôvodnenie [pozri dokument GD 39 (2)]. Zvieratá vystavené pôsobeniu aerosólov v komorách na expozíciu celého tela by mali byť umiestnené samostatne, aby sa zabránilo požitiu testovanej chemikálie v dôsledku očisťovania tela ostatnými zvieratami v klietke. Počas trvania expozície by sa zviera nemalo kŕmiť. V priebehu expozície celého tela sa zvieraťu môže podať voda.

14. Zvieratá sú vystavené pôsobeniu testovanej chemikálie vo forme plynu, pary, aerosólu alebo ich kombinácie. Fyzikálne skupenstvo, ktoré sa testuje, závisí od fyzikálno-chemických vlastností testovanej chemikálie, zvolenej koncentrácie a/alebo najpravdepodobnejšej fyzikálnej formy pri manipulácii a používaní testovanej chemikálie. Hygroskopické a chemicky reaktívne testované chemikálie by sa mali testovať v podmienkach suchého vzduchu. Treba dbať na to, aby sa nevytvorili výbušné koncentrácie.

▼M4

Rozdelenie veľkosti častíc

15. Častice by sa mali rozdeliť podľa veľkosti v prípade všetkých aerosólov a pár, ktoré môžu kondenzovať a vytvárať aerosóly. Na umožnenie expozície všetkých relevantných oblastí dýchacej sústavy sa odporúčajú aerosóly so stredným aerodynamickým hmotnostným priemerom (MMAD) v rozsahu od 1 do 4 μm so štandardnou odchýlkou geometrického priemeru (σ_g) v rozsahu od 1,5 do 3,0 (2) (9) (10). Hoci by sa malo vynaložiť značné úsilie na dodržanie tejto normy, pokiaľ túto podmienku nie je možné splniť, treba predložiť odborný posudok. Napríklad v prípade kovových dymov môžu byť častice menšie, ako stanovuje táto norma, a takisto nabité častice, vlákna a hygroskopické materiály (ktoré sa vo vlhkom prostredí dýchacej sústavy zväčšujú) môžu túto normu prekračovať.

Príprava testovanej chemikálie v nosiči

16. Na prípravu vhodnej koncentrácie a veľkosti častíc testovanej chemikálie v ovzduší možno použiť nosič. Spravidla sa uprednostňuje voda. Tuhý materiál môže byť podrobený mechanickým procesom s cieľom dosiahnuť požadovanú distribúciu veľkosti častíc, treba však dbať na to, aby sa testovaná chemikália nerozložila ani nezmenila. V prípadoch, v ktorých sa usudzuje, že sa pôsobením mechanických procesov zmenilo zloženie testovanej chemikálie (napr. extrémne teploty spôsobené nadmerným mletím v dôsledku trenia), by sa zloženie testovanej chemikálie malo analyticky overiť. Treba dať dostatočný pozor, aby sa testovaná chemikália neznečistila. Nie je potrebné testovať nedrobivé granulované materiály, ktoré sa účelovo pripravujú tak, aby nebolo možné ich inhalovať. Na preukázanie, že pri manipulácii s granulovaným materiálom nevznikajú dýchateľné častice, by sa mal vykonať test opotrebovania. Ak pri teste opotrebovania nevzniknú dýchateľné látky, treba uskutočniť test inhalačnej toxicity.

Kontrolné zvieratá

17. Súbežná negatívna kontrolná skupina (ovzdušia) nie je potrebná. V prípade, že sa na vytvorenie testovacieho ovzdušia použije iný nosič ako voda, sa kontrolná skupina nosiča použije iba vtedy, ak nie sú k dispozícii staršie údaje o inhalačnej toxicite. Ak sa pri štúdii toxicity testovanej chemikálie pripravenej v nosiči nezistí žiadna toxicita, znamená to, že nosič pri testovanej koncentrácii nie je toxický, a teda kontrola nosiča nie je potrebná.

MONITOROVANIE PODMIENOK EXPOZÍCIE

Prúdenie vzduchu v komore

18. Prúdenie vzduchu cez komoru by sa počas každej expozície malo dôkladne kontrolovať, nepretržite monitorovať a zaznamenávať aspoň raz za hodinu. Monitorovanie koncentrácie testovacieho ovzdušia (alebo stability) je integrálne meranie všetkých dynamických parametrov a poskytuje nepriamy prostriedok kontroly všetkých relevantných dynamických parametrov tvorby ovzdušia. Osobitne treba dbať na to, aby sa zabránilo opätovnému vdýchnutiu v komorách na expozíciu oblasti nosa v prípadoch, v ktorých prúdenie vzduchu cez systém expozície nestačí na zabezpečenie dynamického prúdenia vzduchu s testovanou chemikáliou. Existujú predpísané metodiky, prostredníctvom ktorých možno dokázať, že v zvolených prevádzkových podmienkach nedochádza k opätovnému vdýchnutiu (2) (11). Koncentrácia kyslíka by mala byť minimálne 19 % a koncentrácia oxidu uhličitého by nemala presiahnuť 1 %. Ak existuje dôvod domnievať sa, že tieto normy nie je možné splniť, koncentrácie kyslíka a oxidu uhličitého by sa mali zmerať.

▼M4

Teplota komory a relatívna vlhkosť

19. Komora by sa mala udržiavať pri teplote 22 ± 3 °C. Relatívna vlhkosť v dýchacej zóne zvierat, tak v prípade expozície oblasti nosa, ako aj v prípade expozície celého tela, by sa mala monitorovať a zaznamenávať minimálne trikrát počas expozície v trvaní až štyroch hodín a v prípade kratšej expozície každú hodinu. Relatívna vlhkosť by sa ideálne mala udržiavať v rozsahu od 30 do 70 %, ale môže sa stať, že táto hodnota bude nedosiahnuteľná (napr. v prípade testovania zmesí na báze vody) alebo nemerateľná z dôvodu interferencie testovanej chemikálie a testovacej metódy.

Testovaná chemikália: nominálna koncentrácia

20. Vždy, keď je to možné, by sa mala vypočítať a zaznamenať nominálna koncentrácia expozície v komore. Nominálna koncentrácia je hmotnosť vytvorenej testovanej chemikálie vydelená celkovým objemom vzduchu, ktorý prešiel systémom komory. Nominálna koncentrácia sa nepoužíva na charakterizáciu expozície zvierat, ale porovnanie nominálnej a skutočnej koncentrácie vypovedá o účinnosti vytvárania testovacieho systému, a teda sa môže použiť na zistenie problémov s tvorbou.

Testovaná chemikália: skutočná koncentrácia

21. Skutočná koncentrácia je koncentrácia testovanej chemikálie v dýchacej zóne zvierat v inhalačnej komore. Skutočné koncentrácie možno získať špecifickými metódami (napr. priamym odberom vzorky, adsorpčnými alebo chemicky reaktívnymi metódami a následnou analytickou charakterizáciou) alebo nešpecifickými metódami, ako je gravimetrická filtrová analýza. Použitie gravimetrickej analýzy je prípustné iba v prípade jednozložkových práškových aerosólov alebo aerosólov kvapalín s nízkou prchavosťou, pričom je potrebné túto analýzu podložiť primeranými testovými charakterizáciami predbežných štúdií týkajúcich sa konkrétnej chemikálie. Koncentráciu viaczložkových práškových aerosólov možno takisto stanoviť prostredníctvom gravimetrickej analýzy. V tom prípade sú však potrebné analytické údaje, ktoré dokazujú, že zloženie materiálu vo vzduchu je podobné ako zloženie východiskového materiálu. Ak tieto informácie nie sú dostupné, môže byť potrebná opätovná analýza testovanej chemikálie (ideálne v jej skupenstve v ovzduší) v pravidelných intervaloch v priebehu štúdie. V prípade aerosólových látok, ktoré sa môžu vyparіť alebo môžu sublimovať, by sa malo preukázať, že všetky fázy sa zhromaždili pomocou zvolenej metódy. V správe o štúdii by sa mali uviesť cieľové, nominálne a skutočné koncentrácie. Na výpočet hodnôt smrteľných koncentrácií sa však v štatistických analýzach použijú iba skutočné koncentrácie.

22. Ak je to možné, mala by sa použiť jedna dávka testovanej chemikálie, pričom testovaná vzorka by sa mala uskladniť za podmienok, za ktorých sa zachová jej čistota, homogenita a stabilita. Pred začatím štúdie by mala byť k dispozícii charakterizácia testovanej chemikálie vrátane jej čistoty a, ak je to technicky možné, identity a množstiev identifikovaných kontaminantov a prímesí. Charakterizáciu možno preukázať napríklad týmito údajmi: retenčný čas a relatívna plocha píku, molekulová hmotnosť získaná pomocou analýzy hmotnostnej spektrometrie alebo plynovej chromatografie alebo iné odhady. Hoci za identitu testovanej vzorky testovacie laboratórium nenesie zodpovednosť, je vhodné, aby testovacie laboratórium aspoň čiastočne potvrdilo charakterizáciu poskytnutú dodávateľom (napr. farbu, fyzikálne skupenstvo atď.).

23. Prostredie expozície by malo byť čo najstálejšie a malo by sa nepretržite a/alebo občasne monitorovať v závislosti od metódy analýzy. Ak sa použije občasný odber vzoriek, vzorky ovzdušia komory by sa mali v priebehu štvorhodinovej štúdie odobrať najmenej dvakrát. Ak to pre nízky prietok vzduchu alebo nízke koncentrácie nie je možné, môže sa v priebehu celého intervalu expozície odobrať jedna vzorka. Ak sa medzi jednotlivými vzorkami vyskytnú výrazné výkyvy, pri ďalších testovaných koncentráciách by

▼M4

sa mali použiť štyri vzorky z každej expozície. Jednotlivé vzorky koncentrácie komory by sa nemali odchýliť od strednej koncentrácie o viac ako ± 10 % v prípade plynov a pár alebo o ± 20 % v prípade kvapalných alebo tuhých aerosólov. Čas na dosiahnutie rovnováhy v komore (t_{95}) by sa mal vypočítať a zaznamenať. Interval expozície zahŕňa čas, keď sa testovaná chemikália tvorí, pričom sa zohľadňujú aj časy potrebné na dosiahnutie t_{95}. Usmernenia k odhadovaniu t_{95} sú uvedené v dokumente GD 39 (2).

24. V prípade veľmi komplexných zmesí tvorených plynmi/parami a aerosólov (napr. spaľovacieho ovzdušia a testovaných chemikálií poháňaných účelovými výrobkami/zariadeniami koncového použitia) sa v inhalačnej komore môže každá fáza správať inak, takže by sa mala vybrať aspoň jedna látka slúžiaca ako ukazovateľ (analyt), najčastejšie hlavná aktívna látka v zmesi, každej fázy (plyn/para a aerosól). Ak je testovaná chemikália zmes, v správe by sa mala uviesť analytická koncentrácia zmesi, nielen aktívnej látky alebo zložky (analytu). Ďalšie informácie týkajúce sa skutočných koncentrácií sú uvedené v dokumente GD 39 (2).

Testovaná chemikália: rozdelenie veľkosti častíc

25. Rozdelenie veľkosti častíc aerosólov by sa malo stanoviť aspoň dvakrát v priebehu každej expozície v trvaní štyroch hodín, a to pomocou kaskádového impaktora alebo alternatívneho prístroja, ako je napríklad aerodynamický spektrometer častíc. Ak možno preukázať rovnocennosť výsledkov získaných pomocou kaskádového impaktora a alternatívneho prístroja, potom sa alternatívny prístroj môže používať počas celej štúdie. Druhé zariadenie, ako je gravimetrický filter alebo impinger/premývačka, by sa malo použiť súbežne s hlavným prístrojom na potvrdenie zachytávacej účinnosti hlavného prístroja. Hmotnostná koncentrácia získaná analýzou veľkosti častíc by mala byť v rozsahu primeraných limitov hmotnostnej koncentrácie získanej filtrovou analýzou [pozri dokument GD 39 (2)]. Ak možno preukázať rovnocennosť v počiatočnej fáze štúdie, nie je potrebné vykonávať ďalšie potvrdzujúce merania. V záujme zabezpečenia dobrých životných podmienok pre zvieratá by sa mali prijať opatrenia na minimalizáciu nejednoznačných údajov, ktoré môžu viesť k potrebe opakovať expozíciu. Rozdelenie veľkosti častíc by sa malo vykonať v prípade pár, ak existuje možnosť, že kondenzácia pary môže mať za následok tvorbu aerosólu, alebo ak sa v ovzduší pár zistia častice s potenciálom zmiešaných fáz (pozri odsek 15).

POSTUP

26. Ďalej v texte sú opísané dva druhy štúdií: tradičný protokol a protokol C × t. Obidva protokoly môžu zahŕňať predbežnú štúdiu, základnú štúdiu a/alebo limitný test (tradičný protokol) alebo testovanie pri limitnej koncentrácii (C × t). Ak je známe, že jedno pohlavie je vnímavejšie, vedúci štúdie môže rozhodnúť, že sa na tieto štúdie použije iba vnímavejšie pohlavie. Ak sa v prípade iných hlodavcov ako potkanov použije expozícia oblasti nosa, maximálne trvanie expozície je možné prispôsobiť s cieľom minimalizovať druhovo špecifické utrpenie. Pred začatím by sa mali zvážiť všetky dostupné údaje, aby sa minimalizovalo využívanie zvierat. Napríklad údaje získané s využitím kapitoly B.52 tejto prílohy (4) môžu eliminovať potrebu predbežnej štúdie a môžu takisto preukázať, či je jedno pohlavie vnímavejšie [pozri dokument GD 39 (2)].

▼M4

TRADIČNÝ PROTOKOL

Všeobecné úvahy: Tradičný protokol

27. Pri tradičnej štúdii sú skupiny zvierat vystavené účinkom testovanej chemikálie počas pevne stanoveného obdobia (vo všeobecnosti štyri hodiny) buď v komore na expozíciu oblasti nosa, alebo v komore na expozíciu celého tela. Zvieratá sú exponované limitnej koncentrácii (limitný test) alebo v prípade postupu zahŕňajúceho viac krokov najmenej trom koncentráciám (základná štúdia). Základnej štúdii môže predchádzať predbežná štúdia, pokiaľ neexistujú informácie o testovanej látke, ako je napríklad štúdia B.52 uskutočnená skôr [pozri GD 39 (2)].

Predbežná štúdia: Tradičný protokol

28. Predbežná štúdia sa používa na odhad potencie testovanej chemikálie, identifikáciu rozdielov medzi pohlaviami, pokiaľ ide o vnímavosť, a pomoc pri výbere úrovní koncentrácie pri expozícii pre základnú štúdiu alebo pre limitný test. Pri výbere úrovní koncentrácie na účely predbežnej štúdie by sa mali použiť všetky dostupné informácie vrátane údajov (Q)SAR a údajov o podobných chemikáliách. Pri každej koncentrácii by sa nemali exponovať viac ako tri samce a tri samice (na stanovenie rozdielov medzi pohlaviami môžu byť potrebné tri zvieratá z každého pohlavia). Predbežná štúdia sa môže vykonávať s využitím jednej koncentrácie, ale v prípade potreby je možné testovať aj viac koncentrácií. V rámci predbežnej štúdie by sa nemal testovať taký počet zvierat a koncentrácií, ktorý by pripomínal základnú štúdiu. Namiesto predbežnej štúdie sa môže použiť štúdia B.52 (4) uskutočnená skôr [pozri dokument GD 39 (2)].

Limitný test: Tradičný protokol

29. Limitný test sa používa, ak je známe alebo sa predpokladá, že testovaná chemikália je v podstate netoxická, t. j. vyvoláva toxickú reakciu iba pri koncentrácii vyššej, ako je regulačná limitná koncentrácia. Pri limitnom teste sa jedna skupina troch samcov a troch samíc exponuje testovanej chemikálii pri limitnej koncentrácii. Informácie o toxicite testovanej chemikálie možno získať z poznatkov o podobných testovaných chemikáliách pri zohľadnení identity a percenta zložiek, o ktorých je známe, že sú toxikologicky významné. V situáciách, keď existuje málo informácií alebo neexistujú žiadne informácie o jej toxicite, alebo ak sa očakáva, že testovaná chemikália bude toxická, je potrebné vykonať základný test.

30. Výber limitných koncentrácií zvyčajne závisí od regulačných požiadaviek. Ak sa použije nariadenie (ES) č. 1272/2008, limitná koncentrácia v prípade plynov je 20 000 ppm, v prípade pár 20 mg/l a v prípade aerosólov 5 mg/l (alebo maximálna dosiahnuteľná koncentrácia) (3). V prípade niektorých testovaných chemikálií, najmä vo forme pár a aerosólov, môže byť technicky náročné pripraviť limitné koncentrácie. Pri testovaní aerosólov by hlavným cieľom malo byť dosiahnutie dýchateľnej veľkosti častíc (MMAD 1 – 4 μm). V prípade väčšiny testovaných chemikálií je túto veľkosť možné dosiahnuť pri koncentrácii 2 mg/l. O testovanie aerosólov pri koncentrácii vyššej ako 2 mg/l sa možno pokúšať, iba ak je možné získať dýchateľnú veľkosť častíc [pozri dokument GD 39 (2)]. V nariadení (ES) č. 1272/2008 sa z dôvodu starostlivosti o zvieratá neodporúča testovanie pri koncentrácii vyššej, ako je limitná koncentrácia (3). Limitná koncentrácia by sa mala zvažovať iba vtedy, ak existuje vysoká pravdepodobnosť, že výsledky takéhoto testu by mali priamy význam pre ochranu ľudského zdravia (3), pričom do správy o štúdii treba uviesť odôvodnenie. V prípade potenciálne výbušných testovaných chemikálií treba dbať na to, aby nenastali podmienky, ktoré by mohli viesť k výbuchu. S cieľom zabrániť zbytočnému využívaniu zvierat by sa malo pred limitným testom vykonať testovacie kolo bez zvierat, aby sa zabezpečilo, že v komore je možné dosiahnuť podmienky na účely limitného testu.

▼M4

31. Ak sa pri limitnej koncentrácii pozoruje mortalita alebo moribundita, výsledky limitného testu môžu slúžiť ako predbežná štúdia pre ďalšie testovanie pri iných koncentráciách (pozri základnú štúdiu). Ak fyzikálne alebo chemické vlastnosti testovanej chemikálie znemožňujú dosiahnutie limitnej koncentrácie, mala by sa testovať maximálna dosiahnuteľná koncentrácia. Ak sa pri maximálnej dosiahnuteľnej koncentrácii vyskytne letalita nižšia ako 50 %, ďalšie testovanie nie je potrebné. Ak nebolo možné dosiahnuť limitnú koncentráciu, v správe o štúdii treba uviesť vysvetlenie a podložiť ho údajmi. Ak maximálna dosiahnuteľná koncentrácia pary nevyvoláva toxicitu, môže byť potrebné pripraviť testovanú chemikáliu ako kvapalný aerosól.

Základná štúdia: Tradičný protokol

32. Základná štúdia sa zvyčajne vykonáva s využitím piatich samcov a piatich samíc (alebo päť zvierat vnímavejšieho pohlavia, ak je známe) pri jednej úrovni koncentrácie, pričom sa testujú najmenej tri úrovne koncentrácie. Na zabezpečenie dôkladnej štatistickej analýzy by sa mali použiť dostatočné úrovne koncentrácie. Časový interval medzi skupinami expozícií je určený nástupom, trvaním a závažnosťou príznakov toxicity. Expozícia zvierat pri ďalšej úrovni koncentrácie by sa mala odložiť, kým sa nenadobudne dostatočná dôvera, že zvieratá, ktoré boli testované, prežijú. To umožní vedúcemu štúdie, aby prispôsobil cieľovú koncentráciu pre ďalšiu expozičnú skupinu. Z dôvodu závislosti od sofistikovaných technológií to v prípade inhalačných štúdií nemusí byť vždy možné, takže expozícia zvierat pri ďalšej úrovni koncentrácie by mala vychádzať z predchádzajúcich skúseností a vedeckého posudku. Pri testovaní zmesí si treba preštudovať dokument GD 39 (2).

PROTOKOL KONCENTRÁCIA × ČAS (C × t)

Všeobecné úvahy: Protokol C × t

33. O štúdii C × t pozostávajúcej z viacerých krokov možno pri hodnotení inhalačnej toxicity uvažovať ako o alternatíve k tradičnému protokolu (12) (13) (14). Tento prístup umožňuje, aby boli zvieratá exponované testovanej chemikálii pri viacerých úrovniach koncentrácie a počas niekoľkých časových intervalov. Celé testovanie prebieha v komore na expozíciu oblasti nosa (v prípade tohto protokolu nie je možné použiť komory na expozíciu celého tela). Tento protokol je znázornený v tokovom diagrame v dodatku 1. Zo simulačnej analýzy vyplynulo, že v prípade tradičného protokolu, ako aj v prípade protokolu C × t možno získať spoľahlivé hodnoty LC_{50}, ale protokol C × t je všeobecne lepší na získanie spoľahlivých hodnôt LC_{01} a LC_{10} (15).

34. Simulačná analýza preukázala, že využívanie dvoch zvierat pre jeden interval C × t (jedno zviera z každého pohlavia pri použití oboch pohlaví alebo dve zvieratá vnímavejšieho pohlavia) môže byť vo všeobecnosti v prípade základnej štúdie vhodné pri testovaní štyroch koncentrácií a piatich intervalov expozície. Za určitých okolností sa vedúci štúdie môže rozhodnúť pre použitie dvoch potkanov z každého pohlavia pre jeden interval C × t (15). Použitie dvoch zvierat z každého pohlavia na jednu koncentráciu a časový bod môže znížiť chybu a variabilitu odhadov, zvýšiť úspešnosť odhadu a zvýšiť istotu, pokiaľ ide o rozsah intervalov. V prípade nedostatočne presnej zhody s údajmi pre odhad (pri použití jedného zvieraťa z každého pohlavia alebo dvoch zvierat vnímavejšieho pohlavia) môže postačovať aj piata expozičná koncentrácia. Ďalšie usmernenia týkajúce sa počtu zvierat a koncentrácií, ktoré sa majú použiť v prípade štúdie C × t, sú uvedené v dokumente GD 39 (2).

▼M4

Predbežná štúdia: Protokol C × t

35. Predbežná štúdia sa používa na odhad potencie testovanej chemikálie a na pomoc pri výbere úrovní expozičných koncentrácií pre základnú štúdiu. Pri predbežnej štúdii, pri ktorej sa využívajú až tri zvieratá z každého pohlavia na koncentráciu [podrobnejšie informácie sú uvedené v dodatku III dokumentu GD 39 (2)], môže byť potrebné vybrať vhodnú počiatočnú koncentráciu pre základnú štúdiu a minimalizovať počet použitých zvierat. Na zistenie rozdielov medzi pohlaviami môže byť nevyhnutné použiť tri zvieratá z každého pohlavia. Tieto zvieratá by sa mali jednorazovo exponovať zvyčajne počas 240 minút. Otázka, či je možné vytvoriť vhodné testovacie ovzdušie, by sa mala posúdiť v priebehu predbežných technických testov bez zvierat. Vo všeobecnosti nie je potrebné vykonávať predbežnú štúdiu, ak sú k dispozícii údaje o mortalite zo štúdie B.52 (4). Pri výbere počiatočnej cieľovej koncentrácie v štúdii B.2 by mal vedúci štúdie zohľadniť štruktúru mortality pozorovanú pri všetkých dostupných štúdiách B.52 (4) pri oboch pohlaviach a pri všetkých testovaných koncentráciách [pozri dokument GD 39 (2)].

Počiatočná koncentrácia: Protokol C × t

36. Počiatočná koncentrácia (expozičné kolo I) (dodatok 1) bude buď limitná koncentrácia, alebo koncentrácia, ktorú vyberie vedúci štúdie na základe predbežnej štúdie. Skupiny po jednom zvierati z každého pohlavia sú exponované tejto koncentrácii počas niekoľkých intervalov (napr. 15, 30, 60, 120 alebo 240 minút), čo vedie k celkovému počtu desiatich zvierat (tzv. expozičné kolo I) (dodatok 1).

37. Výber limitných koncentrácií zvyčajne závisí od regulačných požiadaviek. Ak sa použije nariadenie (ES) č. 1272/2008, limitná koncentrácia v prípade plynov je 20 000 ppm, v prípade pár 20 mg/l a v prípade aerosólov 5 mg/l (alebo maximálna dosiahnuteľná koncentrácia) (3). V prípade niektorých testovaných chemikálií, najmä vo forme pár a aerosólov, môže byť technicky náročné pripraviť limitné koncentrácie. Pri testovaní aerosólov by malo byť cieľom dosiahnutie dýchateľnej veľkosti častíc (t. j. MMAD 1 – 4 μm) pri limitnej koncentrácii 2 mg/l. Túto veľkosť je možné dosiahnuť v prípade väčšiny testovaných chemikálií. O testovanie aerosólov pri koncentrácii vyššej ako 2 mg/l sa možno pokúšať, iba ak je možné získať dýchateľnú veľkosť častíc [pozri dokument GD 39 (2)]. V nariadení (ES) č. 1272/2008 sa z dôvodu starostlivosti o zvieratá neodporúča testovanie pri koncentrácii vyššej, ako je limitná koncentrácia (3). Testovanie pri limitnej koncentrácii by sa malo zvažovať iba vtedy, ak existuje vysoká pravdepodobnosť, že výsledky takéhoto testu by mali priamy význam pre ochranu ľudského zdravia (3), pričom do správy o štúdii treba uviesť odôvodnenie. V prípade potenciálne výbušných testovaných chemikálií treba dbať na to, aby nenastali podmienky, ktoré by mohli viesť k výbuchu. S cieľom zabrániť zbytočnému využívaniu zvierat by sa malo pred testovaním pri počiatočnej koncentrácii vykonať testovacie kolo bez zvierat, aby sa zaistilo, že v komore je možné zabezpečiť podmienky na dosiahnutie tejto koncentrácie.

38. Ak sa pri počiatočnej koncentrácii pozoruje mortalita alebo moribundita, výsledky pri tejto koncentrácii môžu slúžiť ako východisko na ďalšie testovanie pri iných koncentráciách (pozri základnú štúdiu). Ak fyzikálne alebo chemické vlastnosti testovanej chemikálie znemožňujú dosiahnutie limitnej koncentrácie, mala by sa testovať maximálna dosiahnuteľná koncentrácia. Ak sa pri maximálnej dosiahnuteľnej koncentrácii vyskytne letalita nižšia ako 50 %, ďalšie testovanie nie je potrebné. Ak nebolo možné dosiahnuť limitnú koncentráciu, v správe o štúdii treba uviesť vysvetlenie a podložiť ho údajmi. Ak maximálna dosiahnuteľná koncentrácia pary nevyvoláva toxicitu, môže byť potrebné pripraviť testovanú chemikáliu ako kvapalný aerosól.

▼M4

Základná štúdia: Protokol C × t

39. Počiatočná koncentrácia (expozičné kolo I) (dodatok 1) testovaná v rámci základnej štúdie bude buď limitná koncentrácia, alebo koncentrácia, ktorú vyberie vedúci štúdie na základe predbežnej štúdie. Ak sa v priebehu alebo po kole expozície I pozoruje mortalita, minimálna expozícia (C × t), ktorá má za následok mortalitu, sa použije ako smerodajný údaj na stanovenie koncentrácie a intervalov expozície pre kolo expozície II. Každé následné kolo expozície bude závisieť od predchádzajúceho kola (pozri dodatok 1).

40. V prípade mnohých testovaných chemikálií budú výsledky získané pri počiatočnej koncentrácii spolu s tromi ďalšími kolami expozície s využitím hustejšej súradnicovej siete (t. j. geometrického rozloženia intervalov expozície určeného faktorom medzi intervalmi, ktoré nasledujú po sebe, zvyčajne s hodnotou √2) na stanovenie závislosti mortality v rámci štúdie C × t postačujúce (15). Použitie piatej expozičnej koncentrácie však môže mať isté výhody [pozri dodatok 1 a dokument GD 39 (2)]. Matematická úprava výsledkov protokolu C × t je uvedená v dodatku 1.

POZOROVANIA

41. Zvieratá by sa mali v priebehu trvania expozície pravidelne klinicky pozorovať. Po expozícii by sa mali klinické pozorovania vykonať najmenej dvakrát v deň expozície alebo častejšie, ak to indikuje reakcia zvierat na testovanie, a následne najmenej raz denne počas 14 dní. Dĺžka pozorovania nie je presne určená, ale mala by sa stanoviť podľa charakteru a času nástupu klinických príznakov a dĺžky obdobia zotavenia. Časy, keď sa objavia a zmiznú príznaky toxicity, sú dôležité, predovšetkým v prípade tendencie oneskorenia príznakov toxicity. Všetky pozorovania sa systematicky zaznamenávajú, pričom každé zviera má individuálny záznam. Moribundné zvieratá a zvieratá, ktoré majú očividne silné bolesti a/alebo vykazujú pretrvávajúce príznaky silného utrpenia, by sa mali z dôvodu starostlivosti o zvieratá humánnym spôsobom utratiť. Pri vyšetrovaní klinických príznakov toxicity treba dávať pozor, aby sa počiatočný nepatrný nález a krátkodobé zmeny dýchania, ktoré sú dôsledkom expozície, nezamieňali za toxicitu súvisiacu s testovanou chemikáliou, ktorá by vyžadovala predčasné utratenie zvierat. Zohľadnia sa zásady a kritériá zosumarizované v usmerňujúcom dokumente o humánnych parametroch (Humane Endpoints Guidance Document) (GD 19) (7). Keď sa zvieratá usmrtia z humánnych dôvodov alebo sa nájdu uhynuté, je potrebné čo možno najpresnejšie zaznamenať čas uhynutia.

42. Pozorovania v klietkach sa zameriavajú na zmeny kože, srsti, očí, slizníc, dýchania, krvného obehu, autonómneho a centrálneho nervového systému, ako aj somatomotoriky a správania. Ak je to možné, zaznamená sa každý rozdiel medzi lokálnymi a systémovými účinkami. Pozornosť sa zameriava na pozorovanie triašky, kŕčov, slinenia, hnačky, letargie, spánku a kómy. Meraním rektálnej teploty možno získať dôkazy svedčiace o reflexnej bradypney alebo hypo/hypertermii, ktoré súvisia s testovaním alebo s obmedzením pohybu.

Telesné hmotnosti

43. Individuálne hmotnosti zvierat by sa mali zaznamenať raz počas obdobia aklimatizácie, v deň expozície pred expozíciou (deň 0), minimálne v dňoch 1, 3 a 7 (a následne raz za týždeň) a v čase uhynutia alebo utratenia, pokiaľ k nemu dôjde po dni 1. Telesná hmotnosť sa považuje za kritický ukazovateľ toxicity, takže zvieratá, pri ktorých nastane trvalý úbytok hmotnosti ≥ 20 % v porovnaní s hodnotami pred štúdiou, by sa mali pozorne sledovať. Zvieratá, ktoré prežijú, sa na konci obdobia po expozícii odvážia a humánne usmrtia.

▼M4

Patológia

44. Všetky testované zvieratá vrátane tých, ktoré uhynú počas testu alebo sa utratia a vylúčia zo štúdie z dôvodu starostlivosti o zvieratá, sa podrobujú autopsii. Ak nie je možné vykonať autopsiu ihneď po objavení uhynutého zvieraťa, zviera sa schladí (nie zmrazí) na dostatočne nízku teplotu, aby sa minimalizovala autolýza. Autopsie by sa mali vykonať čo najskôr, zvyčajne v priebehu jedného alebo dvoch dní. Pri každom zvierati sa zaznamenajú všetky makroskopické patologické zmeny, pričom osobitná pozornosť sa venuje akýmkoľvek zmenám v dýchacej sústave.

45. Na účely zvýšenia výpovednej hodnoty štúdie možno zvážiť ďalšie vyšetrenia a priori zahrnuté od začiatku, ako je meranie hmotnosti pľúc potkanov, ktoré prežili, a/alebo poskytnutie dôkazov o podráždení prostredníctvom mikroskopického vyšetrenia dýchacej sústavy. Medzi skúmané orgány môžu patriť aj orgány, ktoré svedčia o makroskopickej patológii pri zvieratách, ktoré prežili 24 alebo viac hodín, a orgány, o ktorých je známe alebo pri ktorých sa predpokladá, že boli zasiahnuté. Mikroskopické vyšetrenie celej dýchacej sústavy môže poskytnúť užitočné informácie o testovaných chemikáliách, ktoré reagujú s vodou, ako sú kyseliny a hygroskopické testované chemikálie.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

46. Treba uviesť údaje o telesnej hmotnosti a pitevných nálezoch jednotlivých zvierat. Údaje z klinických pozorovaní sa zhrnú v podobe tabuliek, kde sa uvedie pre každú pokusnú skupinu počet použitých zvierat, počet zvierat vykazujúcich špecifické príznaky toxicity, počet zvierat, ktoré sa našli uhynuté počas testu alebo ich usmrtili z humánnych dôvodov, čas uhynutia jednotlivých zvierat, opis a časový priebeh toxických účinkov a reverzibility a pitevné nálezy.

Správa o teste

47. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testované zvieratá a chov:

— opis podmienok v klietkach vrátane: počtu (alebo zmeny počtu) zvierat na klietku, výstelky, teploty prostredia a relatívnej vlhkosti, dĺžky svetlej fázy a identifikácie krmiva,

— použité druhy/kmene a odôvodnenie použitia druhov iných ako potkany,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— metóda randomizácie,

— údaje o kvalite krmiva a vody (vrátane druhu/zdroja krmiva, zdroja vody),

— opis akýchkoľvek podmienok pred testovaním vrátane krmiva, karantény a liečby chorôb.

▼M4

Testovaná chemikália:

— fyzikálny charakter, čistota a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti (vrátane izomerizácie),

— identifikačné údaje a registračné číslo CAS (Chemical Abstract Services), ak je známe.

Nosič:

— odôvodnenie použitia nosiča a odôvodnenie výberu nosiča (ak je iný ako voda),

— historické alebo súčasné údaje preukazujúce, že nosič nemá vplyv na výsledky štúdie.

Inhalačná komora:

— opis inhalačnej komory vrátane rozmerov a objemu,

— zdroj a opis zariadenia použitého na expozíciu zvierat, ako aj na vytvorenie ovzdušia,

— zariadenie na meranie teploty, vlhkosti, veľkosti častíc a skutočnej koncentrácie,

— zdroj vzduchu a manipulácia s dodaným/extrahovaným vzduchom a použitý klimatizačný systém,

— metódy použité na kalibráciu zariadenia s cieľom zabezpečiť homogénne testovacie ovzdušie,

— rozdiel tlakov (pozitívny alebo negatívny),

— expozičné otvory na jednu komoru (v prípade expozície oblasti nosa), umiestnenie zvierat v systéme (v prípade expozície celého tela),

— dočasná homogenita/stabilita testovacieho ovzdušia,

— umiestnenie senzorov teploty a vlhkosti a odber vzorky testovacieho ovzdušia v komore,

— hodnoty prietoku vzduchu, prietok vzduchu na jeden expozičný otvor (v prípade expozície oblasti nosa) alebo množstvo zvierat na komoru (v prípade expozície celého tela),

— informácie o zariadení použitom na meranie kyslíka a oxidu uhličitého, ak sa použilo,

— čas potrebný na dosiahnutie rovnováhy v inhalačnej komore (t_{95}),

— počet zmien objemu za hodinu,

— meracie prístroje (ak sa použili).

Údaje o expozícii:

— odôvodnenie výberu cieľovej koncentrácie pre základnú štúdiu,

— nominálne koncentrácie (celková hmotnosť testovanej chemikálie aplikovanej do inhalačnej komory vydelená objemom vzduchu, ktorý prešiel komorou),

— skutočné koncentrácie testovanej chemikálie zachytenej z dýchacej zóny zvierat, v prípade zmesí, ktoré vytvárajú heterogénne fyzikálne skupenstvá (plyny, pary, aerosóly) možno každé skupenstvo analyzovať samostatne,

▼M4

— všetky koncentrácie ovzdušia sa zaznamenajú v hmotnostných jednotkách (napr. mg/l, mg/m^3 atď.), v zátvorke možno uviesť aj objemové jednotky (napr. ppm, ppb atď.),

— rozdelenie veľkosti častíc, stredný aerodynamický hmotnostný priemer (MMAD) a štandardná odchýlka geometrického priemeru (σg) vrátane metód ich výpočtu. Jednotlivé analýzy veľkosti častíc sa uvedú v správe.

Podmienky testovania:

— podrobné informácie o príprave testovanej chemikálie vrátane podrobných údajov o všetkých postupoch použitých na zmenšenie veľkosti častíc tuhých materiálov alebo na prípravu roztokov testovanej chemikálie. V prípadoch, v ktorých v dôsledku mechanických procesov mohlo dôjsť k zmene zloženia testovanej chemikálie, sa uvedú výsledky analýzy na overenie zloženia testovanej chemikálie,

— opis (podľa možnosti spolu s nákresom) zariadenia použitého na vytvorenie testovacieho ovzdušia a na expozíciu zvierat testovaciemu ovzdušiu,

— podrobné informácie o použitej chemickej analytickej metóde a o overení metódy (vrátane účinnosti výťažnosti testovanej chemikálie z prostriedku na odber vzorky),

— odôvodnenie výberu testovacích koncentrácií.

Výsledky:

— tabuľkové spracovanie teploty, vlhkosti a prúdenia vzduchu v komore,

— tabuľkové spracovanie údajov o nominálnych a skutočných koncentráciách,

— tabuľkové spracovanie údajov o veľkosti častíc vrátane údajov o odbere vzoriek na analýzu, o rozdelení veľkosti častíc a o výpočtoch MMAD a σ_g,

— tabuľkové spracovanie získaných údajov o reakcii a úrovni koncentrácie pre každé zviera (t. j. zvieratá vykazujúce príznaky toxicity vrátane mortality, charakteru, závažnosti, času nástupu a trvania účinkov),

— telesné hmotnosti jednotlivých zvierat zistené počas štúdie, dátum a čas uhynutia, ak k nemu došlo pred plánovaným utratením, časový priebeh nástupu príznakov toxicity a skutočnosť, či tieto príznaky boli reverzibilné pre každé zviera,

— pitevné nálezy a histopatologické nálezy pre každé zviera, ak sú k dispozícii,

— odhady letality (napr. LC_{50}, LD_{01}) vrátane 95 % hranice spoľahlivosti a sklon (ak je v rámci metódy hodnotenia k dispozícii),

— štatistický vzťah vrátane odhadu exponenta n (protokol C × t). Uvedie sa názov použitého štatistického softvéru.

▼M4

Rozbor a interpretácia výsledkov:

— osobitný dôraz sa kladie na opis metód použitých na splnenie kritérií tejto testovacej metódy, napr. limitnej koncentrácie alebo veľkosti častíc,

— dýchateľnosť častíc vzhľadom na celkové zistenia sa uvedie, najmä ak nebolo možné splniť kritériá na veľkosť častíc,

— uvedie sa vysvetlenie, ak bolo potrebné humánnym spôsobom utratiť zvieratá, ktoré mali bolesti alebo vykazovali príznaky silného alebo pretrvávajúceho utrpenia, v súlade s kritériami v usmerňovacom dokumente OECD o humánnych parametroch (Guidance Document on Humane Endpoints) (8),

— ak bolo testovanie podľa kapitoly B.52 tejto prílohy (4) prerušené v prospech tejto testovacej metódy B.2, uvedie sa odôvodnenie,

— konzistencia metód použitých na stanovenie nominálnej a skutočnej koncentrácie a vzťah skutočnej koncentrácie k nominálnej koncentrácii sa uvedú v celkovom hodnotení štúdie,

— uvedie sa pravdepodobná príčina uhynutia a prevládajúci druh pôsobenia (systémové verzus lokálne).

LITERATÚRA

1. OECD (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paríž. K dispozícii na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

2. OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paríž. K dispozícii na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

3. Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006 (Ú. v. EÚ L 353, 31.12.2008, s. 1).

4. Kapitola B.52 tejto prílohy, Akútna inhalačná toxicita – metóda akútnej toxickej triedy (ATC).

5. Kapitola B.40 tejto prílohy, Poleptanie kože *in vitro*: test pomocou transkutánneho elektrického odporu (TER).

6. Kapitola B.40a tejto prílohy, Poleptanie kože *in vitro*: test pomocou modelu ľudskej kože.

7. OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paríž. K dispozícii na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

8. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, OECD, Paríž. K dispozícii na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

9. SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321 – 327.

10. Phalen, R. F. (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (druhé vydanie) Informa Healthcare, New York.

▼**M4**

11. Pauluhn, J., a Thiel, A. (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160 – 167.

12. Zwart, J. H. E., Arts, J. M., ten Berge, W. F., Appelman, L. M. (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. Reg. Toxicol. Pharmacol. 15: 278 – 290.

13. Zwart, J. H. E., Arts, J. M., Klokman-Houweling, E. D., Schoen, E. D. (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. Inhal. Toxicol. 2: 105 – 117.

14. Ten Berge, W. F., a Zwart, A. (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. J. Haz. Mat. 21: 65 – 71.

15. OECD (2009). Performance Assessment: Comparison of 403 and C × t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104, OECD, Paríž. K dispozícii na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

16. Finney, D. J. (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, Londýn/New York.

VYMEDZENIE POJMU

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

▼M4

Dodatok 1

Protokol C × t

1. O štúdii „koncentrácia × čas“ (C × t) pozostávajúcej z viacerých krokov možno pri hodnotení inhalačnej toxicity uvažovať ako o alternatíve k tradičnému protokolu (12) (13) (14). Jej vykonanie sa uprednostňuje, ak existuje konkrétna regulačná alebo vedecká potreba, ktorá vyžaduje testovanie na zvieratách počas niekoľkých intervalov, ako napr. v prípade plánovania núdzovej reakcie alebo plánovania využitia krajiny. Tento prístup sa zvyčajne začína testovaním limitnej koncentrácie (kolo expozície I), v rámci ktorého sú zvieratá exponované testovanej chemikálii počas piatich časových intervalov (napr. 15, 30, 60, 120 a 240 minút), takže jedno kolo expozície zahŕňa väčší počet časových intervalov (pozri obrázok 1). Ak sa použije nariadenie (ES) č. 1272/2008, limitná koncentrácia v prípade plynov je 20 000 ppm, v prípade pár 20 mg/l a v prípade aerosólov 5 mg/l. Tieto úrovne možno prekročiť iba vtedy, ak existuje regulačná alebo vedecká potreba testovania pri týchto úrovniach (pozri odsek 37 v hlavnom texte kapitoly B.2).

2. V situáciách, keď je k dispozícii málo informácií o toxicite testovanej chemikálie alebo nie sú k dispozícii žiadne informácie, sa vykoná predbežná štúdia, v rámci ktorej sú skupiny maximálne troch zvierat z každého pohlavia exponované cieľovým koncentráciám, ktoré vyberie vedúci štúdie, zvyčajne počas 240 minút.

3. Ak sa limitná koncentrácia testuje počas kola expozície I a je pozorovaná mortalita nižšia ako 50 %, ďalšie testovanie nie je potrebné. Ak existuje regulačná alebo vedecká potreba, aby sa stanovil vzťah medzi koncentráciou, časom a reakciou pri vyšších úrovniach, ako je indikovaná limitná koncentrácia, ďalšia expozícia sa vykoná pri vyššej úrovni, napríklad pri dvojnásobku limitnej koncentrácie (t. j. 2L na obrázku 1).

4. Ak sa pri limitnej koncentrácii zistí toxicita, je potrebné ďalšie testovanie (základná štúdia). Tieto ďalšie expozície sa vykonajú buď pri nižších koncentráciách (na obrázku 1: kolá expozície II, III alebo IV‘), alebo pri vyšších koncentráciách s využitím kratších časových intervalov (na obrázku 1: kolo expozície IV), ktoré sú prispôsobené a medzi ktorými nie je veľký časový odstup.

5. Test (počiatočná a ďalšia koncentrácia) sa vykoná s využitím jedného zvieraťa z každého pohlavia na koncentráciu/časový bod alebo dvoch zvierat vnímavejšieho pohlavia na koncentráciu/časový bod. Za určitých okolností sa vedúci štúdie môže rozhodnúť pre použitie dvoch potkanov z každého pohlavia na koncentráciu/časový bod (alebo štyroch zvierat vnímavejšieho pohlavia na koncentráciu/časový bod) (15). Použitie dvoch zvierat z každého pohlavia na koncentráciu/časový bod vo všeobecnosti znižuje chybu a variabilitu odhadov, zvyšuje úspešnosť odhadu a zvyšuje istotu, pokiaľ ide o rozsah intervalov v súvislosti s protokolom, ktorý je v tomto texte opísaný. Ďalšie informácie sú uvedené v dokumente GD 39 (2).

6. Podľa možnosti sa každé kolo expozície uskutoční v jeden deň. Vďaka tomu možno odložiť ďalšiu expozíciu, kým sa nenadobudne primeraná istota prežitia zvierat, a vedúci štúdie môže prispôsobiť cieľovú koncentráciu a intervaly pre ďalšie kolo expozície. Odporúča sa začať každé kolo expozície skupinou, ktorá bude exponovaná najdlhšie, napr. skupinou na 240-minútovú expozíciu, po ktorej nasleduje skupina na 120-minútovú expozíciu atď. Ak napríklad zvieratá v skupine na 240-minútovú expozíciu hynú po 90 minútach alebo vykazujú závažné príznaky toxicity (napr. extrémne zmeny v dýchaní, ako je napríklad namáhavé dýchanie), nemá význam exponovať skupinu na 120 minút, lebo mortalita by pravdepodobne dosiahla 100 %. Vedúci štúdie preto pre danú koncentráciu zvolí kratšie intervaly expozície (napr. 90, 65, 45, 33 a 25 minút).

▼M4

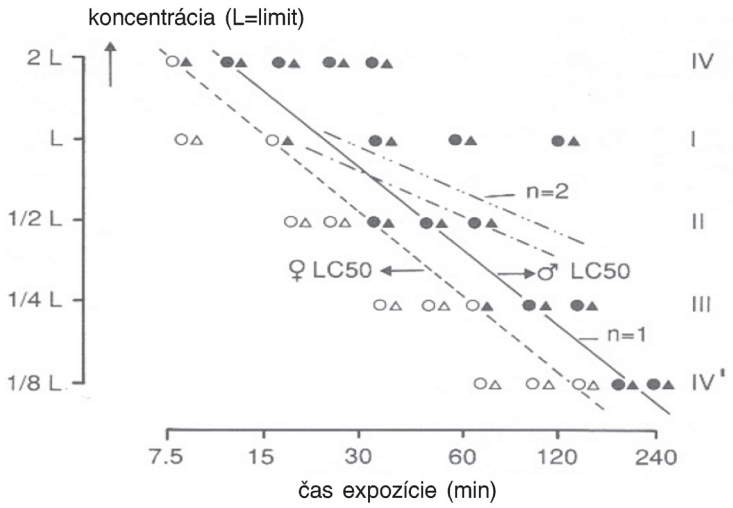
7. Koncentrácia v komore sa musí často merať, aby sa stanovil časovo vážený priemer koncentrácií pre každý interval expozície. Ak je to možné, v štatistickej analýze sa použije čas uhynutia každého zvieraťa (nie interval expozície).

8. Výsledky prvých štyroch kôl expozície sa preskúmajú s cieľom zistiť chýbajúce údaje na krivke závislosti koncentrácie a času (pozri obrázok 1). V prípade nedostatočnej zhody sa môže vykonať ďalšia expozícia (piata koncentrácia). Koncentrácia a intervaly expozície sa v prípade piatej expozície vyberú tak, aby sa zistili tieto chýbajúce údaje.

9. Všetky kolá expozície (vrátane prvého kola expozície) sa použijú na výpočet vzťahu medzi koncentráciou, časom a reakciou s využitím štatistickej analýzy (16). Ak je to možné, pre každý interval C × t sa použije časovo vážený priemer koncentrácií a trvanie expozície až do uhynutia (ak k uhynutiu došlo v priebehu expozície).

Obrázok 1

Hypotetické znázornenie vzťahu medzi koncentráciou, časom a mortalitou pri potkanoch



Prázdne symboly = zvieratá, ktoré prežili; plné symboly = uhynuté zvieratá.

Trojuholníky = samice; kruhy = samce.

Plná čiara = hodnoty LC_{50} (rozsah 7,5 – 240 min.) pre samce, ak n = 1.

Prerušovaná čiara = hodnoty LC_{50} (rozsah 7,5 – 240 min.) pre samice, ak n = 1.

Bodkované čiary = funkcia hypotetických hodnôt LC_{50} pre samce a samice, ak n = 2 (12).

Glosár

Koncentrácia:

Čas expozície:

▼M4

10. Ďalej je uvedený príklad postupu pozostávajúceho z viacerých krokov:

Kolo expozície I – testovanie pri limitnej koncentrácii (pozri obrázok 1)

— 1 zviera z každého pohlavia na koncentráciu/časový bod, spolu desať zvierat ([a])

— cieľová koncentrácia ([b]) = limitná koncentrácia,

— exponujte päť skupín zvierat pri tejto cieľovej koncentrácii počas intervalov 15, 30, 60, 120 a 240 minút.

↓

Kolo expozície II ([c]) – základná štúdia

— 1 zviera z každého pohlavia na koncentráciu/časový bod, spolu desať zvierat,

— exponujte päť skupín zvierat pri nižšej koncentrácii ([d]) (1/2L) počas o niečo dlhších intervalov expozície (faktor √2 s využitím odstupov, pozri obrázok 1).

↓

Kolo expozície III – základná štúdia

— 1 zviera z každého pohlavia na koncentráciu/časový bod, spolu desať zvierat,

— exponujte päť skupín zvierat pri nižšej koncentrácii ([d]) (1/4L) počas o niečo dlhších intervalov expozície (faktor √2 s využitím odstupov, pozri obrázok 1).

↓

Kolo expozície IV‘ – základná štúdia

— 1 zviera z každého pohlavia na koncentráciu/časový bod, spolu desať zvierat,

— exponujte päť skupín zvierat pri nižšej koncentrácii ([d]) (1/8L) počas o niečo dlhších intervalov expozície (faktor √2 s využitím odstupov, pozri obrázok 1).

↓ alebo

([a]) Ak nie sú k dispozícii informácie o vnímavosti pohlaví, použijú sa potkany oboch pohlaví, t. j. jedno zviera z každého pohlavia na koncentráciu. Na základe existujúcich informácií alebo ak v priebehu tohto kola expozície vyjde najavo, že jedno pohlavie je vnímavejšie, v priebehu ďalšieho testovania sa použije desať zvierat vnímavejšieho pohlavia (dve zvieratá na koncentráciu/časový bod) pri každej úrovni koncentrácie.,

([b]) Ak sa použije nariadenie (ES) č. 1272/2008, limitná koncentrácia v prípade plynov je 20 000 ppm, v prípade pár 20 mg/l a v prípade aerosólov 5 mg/l. V prípade predpokladanej toxicity alebo na základe výsledkov predbežnej štúdie sa zvolia nižšie počiatočné koncentrácie. V prípade regulačnej alebo vedeckej potreby možno použiť vyššie koncentrácie.

([c]) Expozícia zvierat pri ďalšej úrovni koncentrácie by sa podľa možnosti mala odložiť, kým sa nenadobudne dostatočná istota, že zvieratá, ktoré boli exponované skôr, prežijú. To umožní vedúcemu štúdie, aby prispôsobil cieľovú koncentráciu a intervaly pre ďalšie kolo expozície.

([d]) Minimálna dávka (koncentrácia × čas), ktorá mala za následok mortalitu počas testovania pri počiatočnej koncentrácii (prvé kolo expozície), bude smerodajná pri stanovení ďalšej kombinácie koncentrácie a časových intervalov. Koncentrácia sa zvyčajne zníži na polovicu (1/2L) a zvieratá budú exponované v priebehu nového časového obdobia pri hustejšej súradnicovej sieti s využitím geometrického delenia intervalov expozície faktorom 1,4 (√2; pozri odkaz 11) v čase podľa minimálnej letálnej dávky (čas × koncentrácia) pozorovanej počas prvej expozície. Na tomto obrázku (obrázok 1) bola v kole expozície I pozorovaná mortalita po 15 minútach; intervaly počas kola II sa teda sústredia okolo 30 minút a majú trvanie 15, 21, 30, 42 a 60 minút. Po prvých dvoch expozíciách sa dôrazne odporúča zakresliť údaje do podobného obrázka, ako je znázornený vyššie, a overiť, či funkcia závislosti medzi koncentráciou a časom zviera uhol 45 stupňov (n = 1) alebo či je funkcia závislosti medzi koncentráciou, časom a reakciou menej strmá (napr. n = 2) alebo strmšia (napr. n = 0,8). V druhom prípade sa dôrazne odporúča náležite prispôsobiť ďalšie koncentrácie a intervaly.

▼M4

Kolo expozície IV – základná štúdia

— 1 zviera z každého pohlavia na koncentráciu/časový bod, spolu desať zvierat,

— exponujte päť skupín zvierat pri vyššej koncentrácii [e] (2L) počas o niečo kratších intervalov expozície (faktor √2 s využitím odstupov, pozri obrázok 1).

Matematická úprava výsledkov protokolu C × t

11. Pri postupe C × t so štyrmi alebo piatimi expozičnými koncentráciami a piatimi intervalmi sa získa 20 alebo 25 dátových bodov. Pomocou týchto dátových bodov možno s využitím štatistickej analýzy vypočítať vzťah C × t (16):

rovnica 1:

$$Probit(P) = b_0 + b_1 ln\ C + b_2 ln\ t$$

kde C = koncentrácia; t = interval expozície, alebo

rovnica 2:

$$Reakcia = f(C^n t)$$

kde $n = b_1/b_2$.

Pomocou rovnice 1 možno vypočítať hodnotu LC_{50} pre daný časový úsek (napr. 4 hodiny, 1 hodina, 30 minút alebo akýkoľvek časový úsek v rámci testovaných období) pri P = 5 (50 % reakcia). Haberovo pravidlo možno použiť iba v prípade, že n = 1. Hodnotu LC_{01} možno vypočítať pri P = 2,67.

[e] V určitých prípadoch môže byť potrebné zvýšiť koncentráciu (2L) v priebehu nového časového obdobia pri hustejšej súradnicovej sieti s využitím geometrického delenia intervalov expozície faktorom 1,4 (√2) v čase podľa minimálnej letálnej úrovne koncentrácie pozorovanej počas prvej expozície. Minimálne trvanie expozície by podľa možnosti malo presiahnuť päť minút; maximálne trvanie expozície by nemalo presiahnuť osem hodín.

▼B

B.3. **AKÚTNA TOXICITA (DERMÁLNA)**

1. **METÓDA**

1.1. ÚVOD

Pozri všeobecný úvod, časť B (A).

1.2. POJMY

Pozri všeobecný úvod, časť B (B).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Testovaná látka sa nanáša na kožu v odstupňovaných dávkach viacerým testovaným skupinám, a to jedna dávka na jednu skupinu. Nakoniec sa registrujú pozorované príznaky otravy a prípady úmrtia. Zvieratá, ktoré uhynú počas testu, ako aj zvieratá, ktoré prežijú do konca testu, sa pitvú.

Zvieratá so silnými a pretrvávajúcimi príznakmi utrpenia a bolesti sa môžu predčasne humánne usmrtiť. Látky, o ktorých je známe, že týmto spôsobom spôsobujú svojimi žieravými alebo dráždivými účinkami výrazné bolesti a utrpenie, sa nemusia testovať.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY

1.6.1. **Príprava**

Pred testom sa zvieratá vo svojich pokusných klietkach aklimatizujú minimálne päť dní na experimentálne chovateľské a kŕmne podmienky. Pred začatím testu sa zdravé, mladé dospelé zvieratá randomizujú a priraďujú k jednotlivým testovaným skupinám. Asi 24 hodín pred začiatkom testu sa strihaním alebo holením odstráni na chrbte pokusných zvierat srsť. Pri strihaní alebo holení treba brať ohľad na to, aby sa nepoškodila koža zvierat, pretože by to viedlo k zmene priepustnosti. Minimálne 10 % plochy tela je potrebné pripraviť na aplikáciu testovanej látky. Ak sa použijú tuhé látky, ktoré možno prípadne rozdrviť na prášok, mala by sa testovaná látka dostatočne navlhčiť vodou alebo prípadne vhodnou pomocnou látkou, aby sa zabezpečil dobrý kontakt s kožou. Pri použití vehikula sa musí zohľadniť jeho vplyv na vnikanie testovanej látky do kože. Tekuté testované látky sa vo všeobecnosti používajú nezriedené.

1.6.2. **Podmienky skúšania**

1.6.2.1. *Pokusné zvieratá*

Môžu sa použiť dospelé potkany alebo králiky. Môžu sa používať aj iné zvieratá, ale ich použitie sa musí zdôvodniť. Je potrebné používať známe kmene pokusných zvierat. Pre každé pohlavie by nemala byť odchýlka telesnej hmotnosti zvierat daného testu na začiatku testu viac ako ± 20 % od príslušnej strednej priemernej hodnoty.

▼B

1.6.2.2. *Počet a pohlavie*

Používajte minimálne 5 zvierat pre každú koncentráciu. Mali by byť rovnakého pohlavia. Ak sa používajú samičky, nesmú byť po vrhu gravidné. Ak existujú informácie o tom, že jedno pohlavie reaguje výrazne citlivejšie, mali by sa používať zvieratá tohto pohlavia.

Poznámka: Pri testoch akútnej toxicity na zvieratách, ktoré patria k vyššiemu rádu ako hlodavce, sa berie ohľad na použitie menšieho počtu zvierat. Dávky by sa mali voliť starostlivo a veľký dôraz by sa mal klásť na to, aby sa neprekročili primerané toxické dávky. Pri takýchto testoch by sa malo zabrániť podávaniu testovanej látky v letálnych dávkach.

1.6.2.3. *Veľkosti dávok*

Počet veľkostí dávok by mal byť dostatočný, najmenej tri, a dávky by mali byť vhodne odstupňované, aby vznikli skúšobné skupiny s výrazným rozsahom toxických účinkov a mortality. Pri určovaní veľkosti dávok by sa mal zohľadňovať možný žieravý alebo dráždivý účinok. Získané údaje by mali stačiť na zobrazenie krivky o účinku dávky a tam, kde je to možné, aj na prijateľné stanovenie LD_{50}.

1.6.2.4. *Limitný test*

Môže sa vykonať limitný test s jednou jedinou dávkou minimálne 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti na jednej skupine s 5 samčekmi a 5 samičkami pri použití opísaného postupu. Ak sa zistia prípady úmrtia podmienené látkou, mal by sa uvážiť kompletný test.

1.6.2.5. *Čas pozorovania*

Čas pozorovania by mal trvať minimálne 14 dní. Nemal by však byť určený dogmaticky. Musí závisieť od druhu obrazu otravy, časového vzniku symptómov a od trvania zotavovacej fázy. Pozorovací čas sa musí predĺžiť, ak sa to ukáže nevyhnutné. Časový moment, keď vznikajú a odznievajú príznaky otravy, ich trvanie, ako aj čas smrti majú význam hlavne vtedy, ak sú poznateľné príznaky spomalenej úmrtnosti.

1.6.3. **Postup**

Zvieratá by sa mali chovať v klietkach jednotlivo. Testovaná látka sa nanáša jednotne na oblasť, ktorá zodpovedá asi 10 % plochy tela. Pri veľmi toxických látkach môže byť táto plocha menšia, avšak čo možno najväčšia plocha by mala byť pokrytá čo možno najtenšou a naj rovnomernejšou vrstvou.

Testovaná látka musí mať počas expozičnej doby 24 hodín kontakt s kožou prostredníctvom porózneho gázového obväzu a nedráždivej náplaste. Pokusná plocha sa musí okrem toho vhodným spôsobom zakryť, aby sa zafixoval a zaistil gázový obväz a testovaná látka, aby zvieratá nemohli orálne prijímať testovanú látku. Môžu sa použiť aj prostriedky na obmedzenie slobody pohybu, aby zvieratá nemohli orálne prijímať testovanú látku, úplná imobilizácia sa však neodporúča.

▼B

Po uplynutí expozičnej doby sa odstránia zvyšky testovanej látky, pokiaľ sa dá, použitím vody alebo iným vhodným postupom na čistenie kože.

Pozorovania sa systematicky zaznamenávajú. Pre každé zviera sa vyhotovujú individuálne záznamy. Prvý deň sa pozorujú zvieratá často. Minimálne raz v pracovný deň by sa malo vykonať starostlivé klinické vyšetrenie. Ostatné denné pozorovania a príslušné opatrenia majú za cieľ obmedziť stratu zvierat pre štúdiu, napr. autopsiou alebo schladením nájdených uhynutých zvierat a izoláciou alebo humánnym usmrtením slabých alebo umierajúcich zvierat.

Pozorovania obsahujú zmeny na srsti, koži, očiach, slizniciach, zmeny dýchania a krvného obehu, autonómneho a centrálneho nervového systému, ako aj somatomotoriky a správania. Mimoriadnu pozornosť treba venovať trasu, kŕčom, slineniu, hnačkám, letargii, spánku a kóme. Časový moment smrti sa musí zachytiť čo možno najpresnejšie. Zvieratá, ktoré uhynuli počas testu, a zvieratá, ktoré prežili do konca testu, sa pitvú. Všetky patologické zmeny sa musia zaprotokolovať. Ak je to potrebné, musia sa odobrať tkanivá na histopatologické vyšetrenie.

Vyhodnotenie toxicity u druhého pohlavia

Po ukončení testu so zvieratami jedného pohlavia sa podáva testovaná látka skupine minimálne s 5 zvieratami iného pohlavia, aby sa zistilo, či tieto zvieratá nereagujú citlivejšie na testovanú látku. Za určitých okolností môže byť oprávnené použitie menšieho počtu zvierat. Ak existuje dostatok dôkazov o tom, že zvieratá skúmaného pohlavia reagujú výrazne citlivejšie, možno upustiť od testu zvierat iného pohlavia.

2. ÚDAJE

Údaje sa zhrnú do tabuľky, z nej musí pre každú testovanú skupinu vyplývať počet zvierat na začiatku testu, čas smrti jednotlivých zvierat, počet zvierat prejavujúcich iné známky toxicity, opis toxických účinkov a sekčné nálezy. Hmotnosť jednotlivých zvierat sa stanoví a zaznamená krátko pred aplikáciou testovanej látky, potom v týždenných intervaloch a v čase smrti; zmeny hmotnosti treba stanoviť a zaznamenať, ak zvieratá prežívajú dlhšie než jeden deň. Zvieratá, ktoré boli humánnym spôsobom usmrtené kvôli utrpeniu a bolesti vyvolanej aplikovanou látkou, sa zaznamenávajú ako uhynutie vyvolané látkou. Hodnota LD_{50} sa vypočíta pomocou uznávanej metódy.

Vyhodnotenie údajov by malo, ak je to možné, zahŕňať vzťah medzi podávanou dávkou, ako aj vznik a stupeň všetkých abnormalít vrátane zmien v správaní, klinických symptómov ťažkých poškodení, zmien telesnej hmotnosti, úmrtnosti a iných toxikologických účinkov.

3. SPRÁVA

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

▼B

— druh zvierat, kmeň, pôvod, chovateľské podmienky, krmivo atď.,

— podmienky skúšania (vrátane postupu čistenia kože a druhu obväzu – okluzívny alebo neokluzívny),

— veľkosti dávky (s vehikulom, ak sa použije, a koncentrácia),

— pohlavie exponovaných zvierat,

— údaje o reakcii vo forme tabuľky, podľa pohlavia a koncentrácie (počet zvierat uhynutých a humánne usmrtených počas testu, počet zvierat prejavujúcich príznaky toxicity, počet exponovaných zvierat),

— čas smrti po aplikácii dávky, dôvody a kritériá na predčasné usmrcovanie zvierat,

— všetky pozorovania,

— hodnotu LD_{50} pre pohlavie, u ktorého bola vykonaná úplná štúdia, stanovená pre 14-dňové pozorovanie, s uvedením metódy stanovenia,

— 95 % intervalu spoľahlivosti pre LD_{50} (tam, kde je to možné),

— krivku dávok/úmrtnosti a sklon tam, kde to metóda stanovenia umožňuje,

— sekčné nálezy,

— všetky histopatologické nálezy,

— výsledky akéhokoľvek testu na iné pohlavie,

— diskusiu o výsledkoch (zvláštnu pozornosť treba venovať vplyvu, aký môže mať predčasné humánne usmrtenie zvierat počas testu na vypočítanú hodnotu LD_{50}),

— interpretáciu výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B (D).

4. **ODKAZY**

Pozri všeobecný úvod časť B (E).

▼B

B.4. **AKÚTNA TOXICITA: PODRÁŽDENIE/POLEPTANIE KOŽE**

1. **METÓDA**

Táto metóda je rovnocenná s OECD TG 404 (2002).

1.1. ÚVOD

Pri príprave tejto aktualizovanej metódy sa osobitná pozornosť venovala možným zlepšeniam v súvislosti so starostlivosťou o zvieratá a posúdeniu všetkých existujúcich informácií o testovanej látke, aby sa zabránilo zbytočnému testovaniu na laboratórnych zvieratách. Táto metóda zahrnuje odporúčanie, aby sa pred uskutočnením opísaného *in vivo* testu na poleptanie/podráždenie látkou urobila kritická analýza existujúcich príslušných údajov. Ak dostačujúce údaje nie sú dostupné, môžu sa získať na základe postupného testovania (1). Stratégia testovania zahrnuje vykonanie validovaných a uznaných *in vitro* testov a je uvedená ako príloha k tejto metóde. Okrem toho sa v prípade potreby odporúča v počiatočnom *in vivo* teste použiť postupne, a nie súčasne, tri testovacie náplasti na zviera.

V záujme vedeckej spoľahlivosti a aj starostlivosti o zvieratá sa *in vivo* testovanie nevykonáva, pokiaľ neboli všetky dostupné údaje súvisiace s potenciálnym poleptaním/podráždením kože látkou vyhodnotené v kritickej analýze. Takéto údaje zahrnujú dôkaz z existujúcich štúdií na ľuďoch a/alebo laboratórnych zvieratách, dôkaz o poleptaní/podráždení jednou alebo viacerými štrukturálne príbuznými látkami alebo zmesami takýchto látok, údaje dokazujúce silnú aciditu alebo alkalitu látky (2) (3) a výsledky z validovaných a uznaných *in vitro* alebo *ex vivo* testov (4) (5) (5a). Táto analýza zníži potrebu *in vivo* testovania na poleptanie/podráždenie kože látkami, pre ktoré už existujú dostatočné dôkazy z iných štúdií k uvedeným dvom konečným bodom.

Uprednostňovaná stratégia postupného testovania, ktorá zahrnuje vykonanie validovaných a uznaných *in vitro* alebo *ex vivo* testov na poleptanie/podráždenie, je do tejto metódy zahrnutá ako príloha. Stratégia bola vypracovaná a jednomyseľne odporučená účastníkmi workshopu OECD (6) a bola prijatá ako odporúčaná stratégia testovania v Globálne harmonizovanom systéme pre klasifikáciu chemických látok (GHS) (7). Odporúča sa, aby sa táto stratégia testovania dodržiavala pred uskutočnením *in vivo* testovania. V prípade nových látok sa na získanie vedecky spoľahlivých údajov o poleptaní/podráždení látkou odporúča koncepcia postupného testovania. V prípade existujúcich látok s nedostačujúcimi údajmi o poleptaní/podráždení kože sa vedená stratégia použije na získanie chýbajúcich údajov. Použitie odlišnej stratégie testovania alebo testovacej metódy alebo rozhodnutie nepoužiť koncepciu postupného testovania, je potrebné zdôvodniť.

Ak sa poleptanie alebo podráždenie nemôže stanoviť s použitím kritickej analýzy, ktorá je konzistentná so stratégiou postupného testovania, je potrebné uvažovať o použití *in vivo* testu (pozri prílohu).

▼B

1.2. DEFINÍCIE

Podráždenie kože: je vznik reverzibilného poškodenia kože po aplikácii testovanej látky v trvaní do 4 hodín.

Poleptanie kože: je vznik ireverzibilného poškodenia kože; konkrétne ide o viditeľné nekrózy cez epidermu až do dermy po aplikácii testovanej látky v trvaní do štyroch hodín. Pre reakcie na poleptanie sú typické vredy, krvácanie, krvavé chrasty a na konci pozorovania po 14 dňoch strata farby následkom vyblednutia kože, kompletné partie bez srsti a jazvy. Na vyhodnotenie nejasných poškodení je potrebné uvažovať o vykonaní histopatologického vyšetrenia.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Látka, ktorá sa má testovať, sa aplikuje v jednorazovej dávke na kožu pokusného zvieraťa; neošetrené časti kože testovaného zvieraťa slúžia ako kontrola. V stanovených intervaloch zistí a vyhodnotí stupeň podráždenia/poleptania a následne sa opíše, aby sa zabezpečilo kompletné posúdenie účinkov. Trvanie štúdie má byť dostatočné na posúdenie reverzibility alebo ireverzibility pozorovaných účinkov.

Zvieratá, ktoré vykazujú pretrvávajúce príznaky silného utrpenia a/alebo bolesti v ktoromkoľvek štádiu testu, sa humánnym spôsobom usmrtia a daná látka sa na základe toho posúdi. Kritéria pre rozhodnutie o humánnom spôsobe usmrtenia moribundných a silne trpiacich zvierat je možné nájsť v odkaze (8).

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Príprava na *in vivo* test**

1.4.1.1. *Výber druhu zvierat*

Ako laboratórne zviera sa prednostne používa králik-albín a použijú sa zdravé mladé dospelé králiky. Použitie iných druhov je potrebné zdôvodniť.

1.4.1.2. *Príprava zvierat*

Približne 24 hodín pred testom sa dôkladným ostrihaním na chrbtovej časti trupu týchto zvierat odstráni srsť. Je potrebné venovať pozornosť tomu, aby sa koža neodrala, a použijú sa iba zvieratá so zdravou, neporušenou kožou.

Niektoré druhy králikov majú miesta s hustou srsťou, ktoré sa objavujú v určitých obdobiach roka. Takéto miesta, zarastené hustou srsťou, by sa nemali používať ako miesta na testovanie.

1.4.1.3. *Podmienky pre umiestnenie a kŕmenie*

Zvieratá sa umiestnia jednotlivo. Teplota miestnosti pre králiky ako pokusné zvieratá má byť 22 °C (± 3 °C). Aj keď relatívna vlhkosť má byť aspoň 30 % a nemala by prevyšovať 70 %, okrem obdobia počas čistenia miestnosti má dosahovať 50 – 60 %. Osvetlenie má byť umelé, v rytme 12 hodín svetlo, 12 hodín tma. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody.

▼B

1.4.2. **Postup testu**

1.4.2.1. *Aplikácia testovanej látky*

Testovaná látka sa aplikuje na malé plochy (približne 6 cm2) kože a zakryje náplasťou z gázy, ktorá sa prichytí leukoplastom, ktorý nespôsobuje podráždenie. V prípadoch, keď nie je možná priama aplikácia (napr. kvapaliny alebo niektoré pasty), sa testovaná látka nanesie najskôr na náplasť z gázy, ktorá sa potom aplikuje na kožu. Náplasť sa voľne prichytí, aby mala kontakt s kožou pomocou vhodného semiokluzívneho obväzu počas trvania expozície. Ak sa testovaná látka aplikuje na náplasť, pripevní sa tak, aby mala dobrý kontakt s kožou a aby látka bola na koži rovnomerne rozložená. Je potrebné zabrániť tomu, aby zviera dosiahlo na náplasť a aby požilo alebo vdýchlo testovanú látku.

Kvapalné testované látky sa zvyčajne používajú neriedené. Pri testovaní tuhých látok (ktoré sa môžu v prípade potreby rozotrieť na prach) sa testovaná látka navlhčí malým množstvom vody (alebo v prípade potreby iným vhodným nosičom), ktoré bude dostatočné na to, aby zabezpečilo dobrý kontakt s kožou. Ak sa použijú iné nosiče ako voda, prípadný vplyv nosiča na podráždenie kože má byť minimálny.

Po skončení expozície, ktorá trvá zvyčajne 4 hodiny, sa zvyšná testovaná látka odstráni podľa potreby s použitím vody alebo vhodného roztoku bez toho, aby sa pozmenila existujúca reakcia alebo integrita epidermy.

1.4.2.2. *Veľkosť dávky*

Na testované miesto sa aplikuje dávka o veľkosti 0,5 ml kvapaliny alebo 0,5 g tuhej látky alebo pasty.

1.4.2.3. *Počiatočný test (*in vivo *test podráždenia/poleptania kože na jednom zvierati)*

Dôrazne sa odporúča, aby sa v *in vivo* počiatočnom teste použilo jedno zviera, najmä keď sa predpokladá, že látka môže byť žieravá. Je to v súlade so stratégiou postupného testovania (pozri prílohu 1).

Keď sa na základe kritickej analýzy usúdi, že látka je žieravá, ďalšie testovanie na zvieratách nie je potrebné. Pre väčšinu látok, o ktorých sa predpokladá, že sú žieravé, ďalšie *in vivo* testovanie zvyčajne nie je potrebné. V tých prípadoch, kde však následkom nedostatočných dôkazov chýbajú ďalšie potvrdzujúce údaje, sa môže vykonať testovanie na zvieratách v obmedzenom rozsahu na základe tohto prístupu: postupne sa aplikujú na zviera tri testovacie náplasti. Prvá náplasť sa odstráni po troch minútach. Ak sa nezistí závažná reakcia kože, aplikuje sa druhá náplasť a odstráni sa po jednej hodine. Ak zo zistení v tomto štádiu vyplýva, že je humánne, aby sa expozícia mohla predĺžiť na štyri hodiny, aplikuje sa tretia náplasť a odstráni sa po štyroch hodinách a reakcia sa vyhodnotí.

Ak sa zistí žieravý účinok po ktorejkoľvek z troch postupných expozícií, test sa ihneď ukončí. Ak sa po odstránení poslednej náplasti nezistí žieravý účinok, zviera sa pozoruje 14 dní, pokiaľ sa poleptanie neprejaví skôr.

▼B

V tých prípadoch, keď sa neočakáva, že testovaná látka spôsobí poleptanie, ale môže byť dráždivá, aplikuje sa jediná náplasť jednému zvieraťu na štyri hodiny.

1.4.2.4. *Potvrdzujúci test (*in vivo *test podráždenia kože na ďalších zvieratách)*

Ak sa nezistí žieravý účinok v počiatočnom teste, dráždivá alebo negatívna reakcia sa potvrdí na maximálne dvoch ďalších zvieratách, každé s jednou náplasťou s časom expozície štyri hodiny. Ak sa v počiatočnom teste zistí dráždivý účinok, môže sa vykonať potvrdzujúci test postupným spôsobom alebo expozíciou dvoch ďalších zvierat súčasne. Vo výnimočnom prípade, keď sa neuskutoční počiatočný test, dvom alebo trom zvieratám sa môže aplikovať jediná náplasť, ktorá sa odstráni po štyroch hodinách. V prípade, keď sa použijú dve zvieratá, ak obidve vykazujú rovnakú reakciu, nie je potrebné ďalšie testovanie. V opačnom prípade sa testuje aj tretie zviera. Môže byť potrebné, aby sa nejednoznačné reakcie vyhodnotili na ďalších zvieratách.

1.4.2.5. *Doba pozorovania*

Dĺžka času pozorovania má byť dostatočná na celkové posúdenie reverzibility zistených účinkov. Pokus je však potrebné ukončiť vždy, keď zviera vykazuje pretrvávajúce príznaky silnej bolesti alebo utrpenia. Na určenie reverzibilných účinkov sa zvieratá pozorujú do 14 dní po odstránení náplastí. Ak sa pozoruje reverzibilita pred uplynutím 14 dní, pokus je potrebné v tomto čase ukončiť.

1.4.2.6. *Klinické pozorovania a vyhodnotenie kožných reakcií*

Všetky zvieratá sa vyšetria, či nemajú príznaky erytému (sčervenania kože) a edému (opuchu) a reakcie po 60 minútach sa vyhodnotia a potom po 24, 48 a 72 hodinách po odstránení náplasti. V prípade počiatočného testu na jednom zvierati sa testované miesto tiež vyšetrí bezprostredne po odstránení náplasti. Kožné reakcie sa vyhodnotia a zaznamenajú podľa stupňov v nižšie uvedenej tabuľke. Ak sa vyskytne poškodenie kože, ktoré nie je možné označiť ako podráždenie alebo poleptanie po 72 hodinách, budú potrebné pozorovania až do 14. dňa, aby sa určila reverzibilita účinkov. Okrem toho na pozorovanie podráždenia, všetky lokálne toxické účinky, ako je odmastenie pokožky a všetky systémové nepriaznivé účinky (napr. účinky na klinické príznaky toxicity a telesnú hmotnosť), sa celkove opíšu a zaznamenajú. Na objasnenie nejednoznačných reakcií je potrebné uvažovať o vykonaní histopatologického vyšetrenia.

Vyhodnotenie kožných reakcií je nevyhnutne subjektívne. Na podporu zosúladenia pri vyhodnocovaní kožnej reakcie a na pomoc testovacím laboratóriám a tým, ktorí sú zainteresovaní na uskutočňovaní a interpretovaní výsledkov, zamestnanci uskutočňujúci vyšetrenia musia byť primerane vyškolení na používanie systému hodnotenia. Užitočnou by mohla byť ilustrovaná príručka na vyhodnotenie podráždenia kože a iných poškodení (9).

2. **ÚDAJE**

2.1. PREDKLADANIE VÝSLEDKOV

Výsledky štúdie sa zhrnú v podobe tabuliek v záverečnej správe z testu a vzťahujú sa na všetky body uvedené v oddiele 3.1.

▼B

2.2. VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV

Stupne podráždenia kože sa posudzujú v súvislosti s charakterom a závažnosťou poškodení a ich reverzibilitou alebo ireverzibilitou. Jednotlivé stupne nepredstavujú pre dráždivé vlastnosti materiálu absolútnu normu, keďže sa hodnotia aj iné účinky testovaného materiálu. Skôr je potrebné na jednotlivé stupne nazerať ako na referenčné hodnoty, ktoré sa majú posudzovať v súvislosti s inými pozorovaniami zo štúdie.

Pri hodnotení dráždivých reakcií je potrebné posúdiť reverzibilitu poškodení kože. Keď reakcie ako alopécia (obmedzená), hyperkeratóza, hyperplázia a šupinatosť pretrvávajú do konca 14-denného obdobia pozorovania, testovaná látka sa pokladá za dráždivú.

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa z testu musí obsahovať tieto informácie:

Zdôvodnenie *in vivo* testovania: kritická analýza údajov z predchádzajúcich testov, vrátane výsledkov zo stratégie postupného testovania:

— opis dôležitých údajov dostupných z predchádzajúceho testovania,

— údaje získané v každom štádiu stratégie testovania,

— opis vykonaných *in vitro* testov, vrátane údajov o postupoch, získaných výsledkov s testovanými/referenčnými látkami,

— kritická analýza pre uskutočnenie *in vivo* štúdie.

Testovaná látka:

— identifikačné údaje (napr. číslo CAS; zdroj; čistota; známe nečistoty; číslo šarže),

— fyzikálny charakter a fyzikálno-chemické vlastnosti (napr. pH, prchavosť, rozpustnosť, stabilita),

— v prípade zmesi, zloženie a vzájomný percentuálny podiel zložiek.

Nosič:

— identifikácia, koncentrácia (v prípade potreby), použitý objem,

— zdôvodnenie výberu nosiča.

Pokusné zvieratá:

— použitý druh/kmeň, zdôvodnenie pre použitie iných zvierat ako králik – albín,

— počet zvierat každého pohlavia,

— hmotnosti jednotlivých zvierat na začiatku a konci testu,

— vek na začiatku štúdie,

— zdroj zvierat, podmienky umiestnenia, krmivo atď.

▼B

Testovacie podmienky:

— technika prípravy miesta pre náplasť,

— údaje o použitých materiáloch na náplasť a metóda pokrytia náplasťou,

— údaje o príprave testovanej látky, aplikácii a odstránení.

Výsledky:

— tabuľkové spracovanie stupňov reakcie podráždenia/poleptania pre každé zviera vo všetkých meraných časoch,

— opisy všetkých pozorovaných poškodení,

— podrobný opis charakteru a stupňa zisteného podráždenia alebo poleptania a všetky histopatologické nálezy,

— opis iných nepriaznivých lokálnych (napr. odmastenie kože) a systémových účinkov okrem podráždenia kože alebo poleptania,

— diskusia k výsledkom.

4. **ODKAZY**

(1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, L, Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410 – 429.

(2) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro,* 2, 19 – 26.

(3) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M. (1998) Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 2(5, 709 – 720.

(4) ECETOC (1990) Monograph No. 15, „Skin Irritation“, European Chemical Industry, Ecology and Toxicology Centre, Brussels.

(5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, pp. 483 – 524.

(5a) Testovacia metóda B.40 Leptanie kože.

(6) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. V Solne, Švédsko, 22. – 24. januára 1996 (http://www 1. oecd. org/ehs/te st/b ackground. htm).

(7) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, potvrdený 28. spoločným zasadaním Výboru pre chemikálie a Pracovnej skupiny pre chemikálie, november 1998 (http://wwwl.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm).

▼B

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (http://www1.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

(9) EPA (1990). Atlas of Dermal Lesions, (20T-2004). United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, August 1990.

[Na požiadanie k dispozícii na sekretariáte OECD].

▼B

Tabuľka I

STUPNE REAKCIÍ KOŽE

Vytvorenie erytému alebo chrasty

Žiadny erytém	0
Veľmi slabý erytém (sotva pozorovateľný)	1
Jasne ohraničený erytém	2
Mierny až silný erytém	3
Výrazný erytém (tmavočervený) až vytvorenie chrasty zabraňujúcej posúdenie erytému	4

Maximálne možný: 4

Vytvorenie edému

Žiadny edém	0
Veľmi slabý edém (sotva pozorovateľný)	1
Slabý edém (okraje oblasti jasne ohraničené zreteľným opuchom)	2
Mierny edém (opuch približne 1 mm)	3
Výrazný edém (opuch viac ako 1 mm a presahujúci za oblasť expozície)	4

Maximálne možný: 4

Na objasnenie nejednoznačných reakcií sa môže vykonať histopatologické vyšetrenie.

▼B

Príloha

Stratégia postupného testovania podráždenia a poleptania kože

VŠEOBECNÉ HĽADISKÁ

V záujme vedeckej spoľahlivosti a starostlivosti o zvieratá je dôležité zabrániť bezdôvodnému používaniu zvierat a minimalizovať každé testovanie, ktoré môže spôsobiť silné reakcie u zvierat. Všetky informácie o látke, týkajúce sa jej potenciálu spôsobiť poleptanie/podráždenie kože, sa posúdia pred uvažovaní o použití *in vivo* testovania. Môže sa stať, že už existujú dostatočné dôkazy na klasifikáciu testovanej látky, pokiaľ ide o jej potenciál spôsobiť poleptanie alebo podráždenie kože bez toho, aby bolo potrebné vykonať testovanie na laboratórnych zvieratách. Z tohto dôvodu použitie kritickej analýzy a stratégie postupného testovania minimalizuje potrebu *in vivo* testovania, najmä ak látka môže spôsobiť silné reakcie.

Odporúča sa, aby sa kritická analýza používala na posúdenie existujúcich informácií týkajúcich sa podráždenia a poleptania kože látkami na zistenie, či je potrebné vykonať ďalšie štúdie iné ako *in vivo* dermálne štúdie na charakterizáciu tohto potenciálu. Ak sú potrebné ďalšie štúdie, odporúča sa, aby sa na získanie potrebných experimentálnych údajov použila stratégia postupného testovania. V prípade látok, ktoré sa ešte netestovali, sa použije stratégia postupného testovania, aby sa získali údaje potrebné na vyhodnotenie jej potenciálu spôsobiť poleptanie/-podráždenie kože. Stratégia testovania opísaná v tejto prílohe bola vyvinutá na workshope OECD (1) a neskôr bola potvrdená a rozšírená v Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances a potvrdená 28. spoločným zasadaním Výboru pre chemikálie a Pracovnej skupiny pre chemikálie v novembri 1998 (2).

Aj keď táto stratégia postupného testovania nie je integrálnou súčasťou testovacej metódy B.4, vyjadruje odporúčaný prístup pre určenie charakteristík podráždenia/poleptania kože. Tento prístup predstavuje najlepší postup a aj etický štandard pre *in vivo* testovanie na podráždeniee/poleptanie kože. Testovacia metóda poskytuje usmernenie na vykonanie *in vivo* testu a sumarizuje faktory, ktoré je potrebné preskúmať pred začatím takéhoto testu. Stratégia poskytuje prístup pre vyhodnotenie existujúcich údajov o dráždivých/žieravých vlastnostiach testovaných látok a viacstupňový prístup na vytvorenie príslušných údajov o látkach, pre ktoré sú potrebné ďalšie štúdie, alebo pre ktoré sa ešte neuskutočnili žiadne štúdie. Odporúča tiež vykonanie validovaných a uznaných *in vitro* alebo *ex vivo* testov pre poleptanie/podráždenie kože za špecifických podmienok.

OPIS HODNOTENIA A STRATÉGIE TESTOVANIA

Pred uskutočnením testov ako časti stratégie postupného testovania (obrázok) je potrebné vyhodnotiť všetky dostupné informácie na určenie, či je potrebné *in vivo* testovanie kože. Aj keď by sa mohli získať významné informácie z hodnotenia jednotlivých parametrov (napr. extrémna hodnota pH), je potrebné posúdiť úplnosť existujúcich informácií. Všetky dôležité údaje o účinkoch príslušnej látky alebo jej analógov sa vyhodnocujú pri rozhodovaní na základe kritickej analýzy a uvedie sa zdôvodnenie tohto rozhodnutia. Dôraz sa prednostne kladie na existujúce údaje o účinkoch látky na ľudí a zvieratá, za ktorými nasledujú výsledky z *in vitro* alebo *ex vivo* testovania. Vždy, keď je to možné, je potrebné vyhnúť sa uskutočneniu *in vivo* štúdií žieravých látok. Hodnotené faktory v stratégii testovania zahrnujú:

▼B

Vyhodnotenie existujúcich údajov o účinkoch látky na ľudí a zvieratá (stupeň 1). Existujúce údaje o účinkoch na ľudí, napr. klinické alebo štúdie expozície na pracovisku a prípadové správy a/alebo údaje z testov na zvieratách, napr. z jednorazových alebo opakovaných štúdií toxicity dermálnej expozície, sa posúdia ako prvé, pretože poskytujú informácie priamo súvisiace s účinkami na kožu. Látky, ktorých dráždivé alebo žieravé účinky sú známe, a tie látky, u ktorých je jasne dokázané, že nemajú žieravé alebo dráždivé účinky, nie je potrebné testovať v *in vivo* štúdiách.

Analýza súvislostí medzi štruktúrou a aktivitou (ŠAR) (stupeň 2). Posúdia sa výsledky testovania štrukturálne príbuzných látok, ak sú k dispozícii. Ak je k dispozícii dostatok údajov o účinkoch na ľudí a/alebo zvieratá štrukturálne príbuzných látok alebo zmesiach takýchto látok, z ktorých vyplývajú ich možné žieravé/dráždivé účinky na kožu, dá sa predpokladať, že hodnotená testovaná látka vyvolá rovnakú reakciu. V týchto prípadoch sa testovaná látka nemusí testovať. Negatívne údaje zo štúdií štrukturálne príbuzných látok alebo zmesí takýchto látok podľa stratégie postupného testovania neposkytujú dostatočný dôkaz o nežieravých/nedráždivých účinkoch látky. Validované a uznané SAR prístupy sa použijú na identifikáciu potenciálu spôsobiť poleptanie a aj podráždenie kože.

Fyzikálno-chemické vlastnosti a chemická reaktivita (stupeň 3). Látky vykazujúce extrémne hodnoty pH ako $\leq 2{,}0$ a $\geq 11{,}5$ môžu mať veľmi silné lokálne účinky. Ak je extrémna hodnota pH základom pre identifikáciu látky ako žieravú pre kožu, potom jej sa môže tiež zohľadniť jej acidita/alkalita (alebo tlmivá kapacita) (3) (4). Ak z tlmivej kapacity vyplýva, že látka *nemôže* byť pre kožu žieravá, potom sa uskutoční ďalšie testovanie na potvrdenie tejto domnienky, pričom sa prednostne použije validovaný a uznaný *in vitro* alebo *ex vivo* test (pozri stupne 5 a 6).

Dermálna toxicita (stupeň 4). Ak sa dokázalo, že chemikália je veľmi toxická dermálnou cestou a *in vivo* štúdie podráždenia/poleptania kože nie je možné vykonať, pretože množstvo testovanej látky, ktoré sa zvyčajne aplikuje, by mohlo prevýšiť veľmi toxickú dávku a následne spôsobiť uhynutie alebo silné utrpenie zvierat. Okrem toho, ak sa štúdie dermálnej toxicity, pri ktorých sa používajú králiky – albíny, už uskutočnili s limitnou dávkou do 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti alebo vyššou a nepozorovalo sa žiadne podráždenie alebo poleptanie kože, ďalšie testovanie na podráždenie/poleptanie kože sa nemusí vykonať. Pri hodnotení akútnej dermálnej toxicity zo skôr uskutočnených štúdií je potrebné pamätať na množstvo aspektov. Napríklad informácie uvedené v správach o poškodeniach kože môžu byť neúplné. Testovanie a pozorovania sa mohli vykonať na iných druhoch ako králik a v citlivosti svojich reakcií sa môžu druhy značne odlišovať. Aj forma testovanej látky aplikovanej zvieratám nemusí byť vhodná na posúdenie podráždenia/poleptania kože (napr. zriedenie látok na testovanie dermálnej toxicity) (5). V tých prípadoch, keď sa však uskutočnili na králikoch dobre zostavené a vykonané štúdie dermálnej toxicity, môžu sa negatívne zistenia posudzovať ako dostatočný dôkaz, že látka nie je žieravá alebo dráždivá.

Výsledky z in vitro alebo ex vivo testov (stupne 5 a 6). Látky, ktoré dokázali žieravé alebo silne dráždivé vlastnosti vo validovanom a uznanom *in vitro* alebo *ex vivo* teste (6) (7) určenom pre hodnotenie týchto špecifických účinkov, nie je potrebné testovať na zvieratách. Je možné predpokladať, že takéto látky vyvolajú podobné závažné účinky *in vivo*.

▼B

In vivo test na králikoch (stupne 7 a 8). Ak sa zakladá rozhodnutie, či je potrebné vykonať *in vivo* testovanie, na kritickej analýze, malo by sa začať s počiatočným testom na jednom zvierati. Ak výsledky tohto testu preukážu, že látka je žieravá pre kožu, nie je potrebné vykonať ďalšie testovanie. Ak sa nezistí žieravý účinok v počiatočnom teste, dráždivá alebo negatívna reakcia sa potvrdí na maximálne dvoch ďalších zvieratách po dobu expozície štyri hodiny. Ak sa zistí dráždivý účinok v počiatočnom teste, môže sa vykonať potvrdzujúci test postupným spôsobom alebo expozíciou ďalších dvoch zvierat súčasne.

ODKAZY

(1) OECD (1996). Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. V Solne, Švédsko, 22. – 24. januára 1996 (http://www 1. oecd. org/ehs/test/b ackground. htm).

(2) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, potvrdený 28. spoločným zasadaním Výboru pre chemikálie a Pracovnej skupiny pre chemikálie, november 1998 (http://wwwl.oecd.org/ehs/Class/-HCL6.htm).

(3) Worth, A.P., Fentem J.H., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdail D.J., Liebsch M. (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26, 709 – 720.

(4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals. Toxic In Vitro, 2 (1) pp 19 – 26.

(5) Patil, S.M., Patrick, E., Maibach, H.I. (1996) Animal, Human, and In Vitro Test Methods for Predicting Skin Irritation, in: Francis N. Marzulli and Howard I. Maibach (editors): Dermatotoxicology. Fifth Edition ISBN 1-56032-356-6, Chapter 31, 411 – 436.

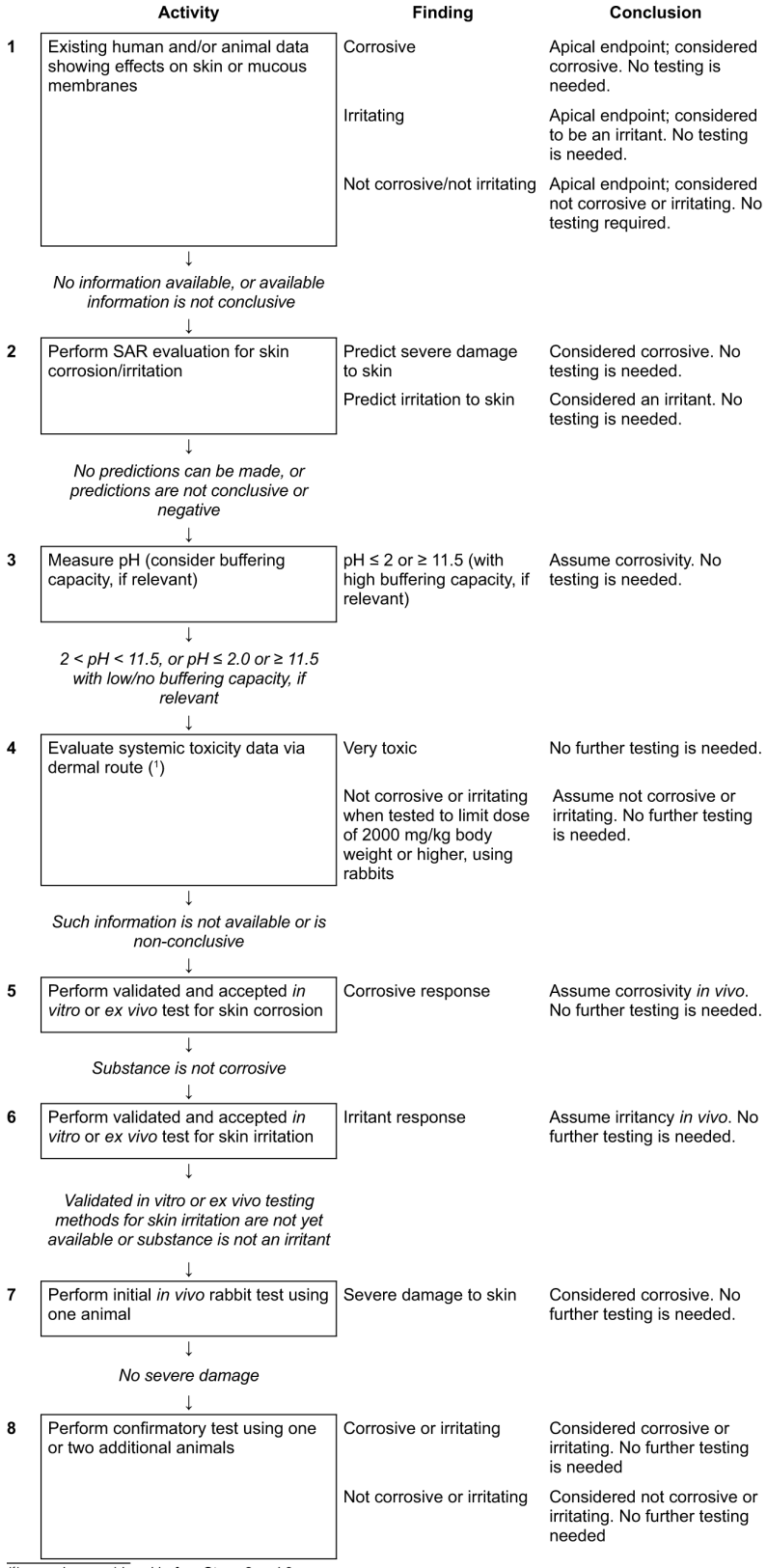
(6) Testovacia metóda B.40.

(7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, pp. 483 – 524.

▼B

Obrázok

STRATÉGIA TESTOVANIA A HODNOTENIE PODRÁŽDENIA KOŽE/POLEPTANIA



(1) can be considered before Steps 2 and 3.

▼B

B.5. **AKÚTNA TOXICITA: PODRÁŽDENIE/POLEPTANIE OKA**

1. **METÓDA**

Táto metóda je rovnocenná s OECD TG 405 (2002).

1.1. ÚVOD

Pri príprave tejto aktualizovanej metódy sa osobitná pozornosť venovala možným zlepšeniam na základe vyhodnotenia všetkých existujúcich informácií o testovanej látke, aby sa zabránilo zbytočnému testovaniu na pokusných zvieratách, a tým zohľadnila ochrana zvierat. Táto metóda zahrnuje odporúčanie, aby sa pred uskutočnením opísaného *in vivo* testu poleptania/podráždenia oka látkou uskutočnila kritická analýza existujúcich príslušných údajov. Ak nie sú k dispozícii dostačujúce údaje, odporúča sa, aby sa získali na základe postupného testovania (2) (3). Stratégia testovania zahrnuje vykonanie validovaných a uznaných *in vitro* testov a je uvedená ako príloha k testovacej metóde. Okrem toho sa odporúča použiť *in vivo* test podráždenia/po leptania kože na predpovedanie poleptania oka pred uvážením *in vivo* očného testu.

V záujme vedeckej spoľahlivosti a aj starostlivosti o zvieratá nie je potrebné uvažovať o *in vivo* testovaní, pokiaľ neboli všetky dostupné údaje súvisiace s potenciálnym poleptaním/podráždením oka látkou vyhodnotené v kritickej analýze. Takéto údaje zahrnujú dôkaz z existujúcich štúdií na ľuďoch a/alebo laboratórnych zvieratách, dôkaz o poleptaní/podráždení jednou alebo viacerými štrukturálne príbuznými látkami alebo zmesami takýchto látok, údaje dokazujúce silnú aciditu alebo alkalitu látky (4) (5) a výsledky z validovaných a uznaných *in vitro* alebo *ex vivo* testov na poleptanie a podráždenie kože (6) (6a). Štúdie je možné vykonať pred kritickou analýzou alebo ako jej výsledok.

V prípade určitých látok takáto analýza môže poukázať na potrebu *in vivo* štúdií potenciálu látky spôsobiť poleptanie/podráždenie oka. Vo všetkých takýchto prípadoch sa pred uvažovaním o použití *in vivo* očného testu pokiaľ možno uskutoční najskôr štúdia *in vivo* účinkov látky na kožu a vyhodnotí sa v súlade s testovacou metódou B.4 (7). Použitie kritickej analýzy a stratégie postupného testovania má znížiť potrebu *in vivo* testovania poleptania/podráždenia oka látkami, pre ktoré už existuje dostatok dôkazov z iných štúdií. Ak sa stanovenie poleptania alebo podráždenia oka nedá vykonať s použitím stratégie postupného testovania, ani po uskutočnení *in vivo* štúdie poleptania a podráždenia kože, môže sa vykonať *in vivo* test poleptania/-podráždenia oka.

▼B

Uprednostňovaná stratégia postupného testovania, ktorá zahrnuje vykonanie validovaných a uznaných *in vitro* alebo *ex vivo* testov poleptania/podráždenia, je zahrnutá v prílohe k tejto testovacej metóde. Stratégia bola vypracovaná a jednomyseľne odporučená účastníkmi workshopu OECD (8) a bola prijatá ako odporúčaná stratégia testovania v Globálne harmonizovanom systéme pre klasifikáciu chemických látok (GHS) (9). Odporúča sa, aby sa táto stratégia testovania dodržiavala pred uskutočnením *in vivo* testovania. V prípade nových látok sa na získanie vedecky spoľahlivých údajov o poleptaní/podráždení látkou odporúča koncepcia postupného testovania. V prípade existujúcich látok s nedostačujúcimi údajmi o poleptaní/podráždení kože a oka sa uvedená stratégia použije na získanie chýbajúcich údajov. Použitie odlišných stratégií testovania alebo testovacieho postupu alebo rozhodnutie nepoužiť koncepciu postupného testovania je potrebné zdôvodniť.

1.2. DEFINÍCIE

Podráždenie oka: je vytvorenie zmien na oku po aplikácii testovanej látky na vonkajší povrch oka, ktoré sú úplne reverzibilné do 21 dní po aplikácii.

Poleptanie oka: je vytvorenie poškodenia tkaniva oka alebo závažné fyzické oslabenie zraku po aplikácii testovanej látky na vonkajší povrch oka, ktoré nie sú úplne reverzibilné do 21 dní po aplikácii.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Testovaná látka sa aplikuje v jednorazovej dávke do jedného oka pokusného zvieraťa; neošetrené oko slúži ako kontrola. Stupeň podráždenia/po leptania oka sa vyhodnotí na základe hodnotenia poškodenia spojoviek, rohovky a dúhovky v špecifických intervaloch. Iné účinky na oku a nepriaznivé systémové účinky sa tiež opíšu, aby sa uviedlo úplné vyhodnotenie účinkov. Trvanie štúdie má byť dostatočné na posúdenie reverzibility alebo ireverzibility účinkov.

Zvieratá vykazujúce pretrvávajúce príznaky silného utrpenia a/alebo bolesti v ktoromkoľvek štádiu testu sa humánnym spôsobom usmrtia a daná látka sa na základe toho zatriedi. Kritéria pre rozhodnutie humánnym spôsobom usmrtiť moribundné a silne trpiace zvieratá je možné nájsť v odkaze (10).

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Príprava na *in vivo* test**

1.4.1.1. *Výber druhov*

Ako laboratórne zviera sa pokiaľ možno použije králik – albín a použijú sa zdravé mladé dospelé zvieratá. Je potrebné uviesť zdôvodnenie, ak sa použijú iné kmene alebo druhy.

1.4.1.2. *Príprava zvierat*

Obe oči každého pokusného zvieraťa, predbežne vybratého na testovanie, sa 24 hodín pred začatím testovania vyšetria. Nepoužijú sa zvieratá vykazujúce podráždenie očí, očné poruchy alebo predchádzajúce zranenie rohovky.

▼B

1.4.1.3. *Podmienky pre umiestnenie a kŕmenie*

Zvieratá majú byť umiestnené jednotlivo. Teplota miestnosti na pokusy s králikmi má byť 22 ºC (± 3 ºC). Aj keď relatívna vlhkosť má byť aspoň 30 % a pokiaľ možno, nemala by prevyšovať 70 %, okrem obdobia počas čistenia miestnosti má dosahovať 50 – 60 %. Osvetlenie má byť umelé, v rytme 12 hodín svetlo, 12 hodín tma. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody.

1.4.2. **Postup testu**

1.4.2.1. *Aplikácia testovanej látky*

Testovaná látka sa umiestni do spojovkového vaku jedného oka každého zvieraťa po jemnom odtiahnutí spodného viečka od očnej gule. Viečka sa jemne podržia pri sebe asi jednu sekundu, aby sa zabránilo stratám materiálu. Druhé oko, ktoré nebolo ošetrené, slúži ako kontrola.

1.4.2.2. *Vymývanie*

Oči testovaných zvierat sa nevymývajú aspoň 24 hodín po nakvapkaní testovanej látky, okrem tuhých látok (pozri oddiel 1.4.2.3.2), a v prípade okamžitých leptavých alebo dráždivých účinkov. Po 24 hodinách sa môžu vymyť, ak sa usúdi, že je to potrebné.

Použitie vedľajšej skupiny zvierat na vyšetrenie vplyvu vymytia sa neodporúča, pokiaľ to nie je vedecky odôvodnené. Ak je potrebná súbežná skupina, použijú sa dva králiky. Podmienky vymytia sa starostlivo zdokumentujú, napr. čas vymytia; zloženie a teplota vymývacieho roztoku, trvanie, objem a rýchlosť aplikácie.

1.4.2.3. *Veľkosť dávky*

1.4.2.3.1. *Testovanie kvapalín*

Pre testovanie kvapalín sa používa dávka 0,1 ml. Na nakvapkanie látky priamo do oka sa nepoužijú pumpičkové spreje. Tekutina zo spreja sa vystrieka a zozbiera v nádobke predtým, ako sa vkvapne do oka 0,1 ml.

1.4.2.3.2. *Testovanie tuhých látok*

Pri testovaní tuhých látok, pást a látok, ktoré sú tvorené z častíc, použité množstvo má mať objem 0,1 ml alebo hmotnosť maximálne 100 mg. Testovaný materiál sa pomelie na jemný prášok. Objem tuhého materiálu sa zmeria po jemnom zhutnení, napr. poklepaním nádobky na meranie. Ak testovaná tuhá látka nebola fyziologicky odstránená z oka pokusného zvieraťa pri prvom zisťovaní v časovom bode 1 hodina po ošetrení, oko sa môže vymyť fyziologickým roztokom alebo destilovanou vodou.

▼B

1.4.2.3.3. *Testovanie aerosólov*

Odporúča sa, aby sa všetky látky v pumpičkových sprejoch a aerosóloch vystriekali a zozbierali pred nakvapkaním do oka. Jedinou výnimkou sú látky v tlakových aerosólových nádobách, ktoré sa nedajú vystriekať a zozbierať kvôli vyparovaniu. V takýchto prípadoch sa oko ponechá otvorené a testovaná látka sa aplikuje do oka ako jednorazové vstrieknutie približne jednu sekundu zo vzdialenosti 10 cm priamo na prednú časť oka. Táto vzdialenosť sa môže meniť v závislosti od tlaku spreja a jeho obsahu. Pozornosť je potrebné venovať tomu, aby sa tlakom zo spreja nepoškodilo oko. V určitých prípadoch môže byť potrebné posúdiť možnosť „mechanického“ poškodenia oka tlakom kvapaliny zo spreja.

Odhad dávky z aerosólu sa môže urobiť simulovaním testu takto: látka sa nasprejuje na navažovací papier cez otvor o veľkosti oka králika, ktoré je umiestnené tesne pred papierom. Na základe zvýšenia hmotnosti papiera sa odhadne množstvo nasprejované do oka. V prípade prchavých látok sa môže dávka odhadnúť tak, že sa nádobka s materiálom odváži pred odstránením testovaného materiálu a po ňom.

1.4.2.4. *Počiatočný test (*in vivo *test podráždenia/poleptania oka na jednom zvierati)*

Ako sa zdôrazňuje v stratégii postupného testovania (pozri prílohu 1), dôrazne sa odporúča, aby sa v *in vivo* test uskutočnil najskôr na jednom zvierati.

Ak z výsledkov tohto testu vyplynie, že látka je žieravá alebo silne dráždivá pre oko s použitím uvedeného postupu, ďalšie testovanie na očnú dráždivosť nie je potrebné vykonať.

1.4.2.5. *Lokálne anestetiká*

Lokálne anestetiká sa môžu použiť v jednotlivých prípadoch. Ak z kritickej analýzy vyplýva, že látka môže spôsobiť bolesť, alebo počiatočné testovanie ukáže, že sa vyskytne bolestivá reakcia, môže sa pred nakvapkaním testovanej látky použiť lokálne anestetikum. Je potrebné starostlivo zvoliť typ, koncentráciu a dávku lokálneho anestetika, aby sa zabezpečilo, že rozdiely v reakcii na testovanú látku nevzniknú na základe toho, že sa použilo. Kontrolné oko sa rovnako ošetrí anestetikom.

1.4.2.6. *Potvrdzujúci test (*in vivo *test podráždenia oka na ďalších zvieratách)*

Ak sa v počiatočnom teste nezistí žieravý účinok, dráždivá alebo negatívna reakcia by sa mal potvrdiť na maximálne dvoch ďalších zvieratách. Ak sa zistí silný dráždivý účinok v počiatočnom teste, z ktorého vyplýva silný (ireverzibilný) účinok v potvrdzujúcom testovaní, odporúča sa, aby sa potvrdzujúci test uskutočnil postupným spôsobom v danom čase na jednom zvierati, a nie súčasnou expozíciou dvoch ďalších zvierat. Ak sa na druhom zvierati prejavia žieravé alebo silne dráždivé účinky, test sa preruší. Ďalšie zvieratá môže byť potrebné použiť na potvrdenie slabých alebo miernych dráždivých reakcií.

▼B

1.4.2.7. *Doba pozorovania*

Dĺžka času pozorovania má byť dostatočná na celkové posúdenie miery a reverzibility zistených účinkov. Pokus je však potrebné ukončiť vždy, keď zviera vykazuje pretrvávajúce príznaky silnej bolesti alebo utrpenia (9). Na stanovenie reverzibility účinkov sa zvieratá zvyčajne pozorujú spravidla 21 dní po podaní testovanej látky. Ak sa zistí reverzibilita pred uplynutím 21 dní, pokus sa v tomto čase ukončí.

1.4.2.7.1. *Klinické pozorovania a vyhodnotenie reakcií oka*

Oči sa vyšetria po 1, 24, 48 a 72 hodinách po aplikácii testovanej látky. Hneď ako sa získa konečná informácia, zvieratá už nie potrebné ďalej testovať. Zvieratá vykazujúce pretrvávajúce príznaky silného utrpenia alebo bolesti sa ihneď humánnym spôsobom usmrtia a daná látka sa na základe toho posúdi. Zvieratá, ktoré po nakvapkaní majú tieto poškodenia oka, sa humánnym spôsobom usmrtia: perforácia rohovky alebo závažná ulcerácia rohovky vrátane stafylomu; krvácanie prednej komory oka; nepriehľadnosť rohovky 4. stupňa, ktoré pretrváva 48 hodín; chýbajúca reakcia zreničiek na svetlo (reakcia dúhovky stupeň 2), ktorá pretrváva 72 hodín; ulcerácia spojovkovej membrány (conjuctivea); nekróza spojoviek alebo tretieho viečka, alebo odlupovanie. Je to kvôli tomu, že takéto poškodenia zvyčajne nie sú reverzibilné.

Zvieratá, u ktorých sa nevyskytlo žiadne poškodenie oka, môžu byť usmrtené najskôr 3 dni po nakvapkaní látky. Zvieratá so slabými až miernymi poškodeniami sa pozorujú, pokiaľ poškodenia nezmiznú, alebo 21 dní, keď je štúdia ukončená. Pozorovania sa uskutočnia na 7., 14. a 21. deň na stanovenie stavu poškodení a ich reverzibility alebo ireverzibility.

Stupne reakcií oka (spojovky, rohovky a dúhovky) sa pri každom vyšetrení zaznamenajú (tabuľka I). Každé ďalšie poškodenia oka (napr. panus, sfarbenie) alebo systémové nepriaznivé účinky sa tiež zaznamenajú.

Na vyšetrenie reakcií sa môže použiť binokulárna lupa, ručná štrbinová lampa alebo biomikroskop, alebo iný vhodný prístroj. Po tom, ako sa zaznamenajú zistenia po 24 hodinách, sa ďalej môžu oči vyšetriť fluoresceínom.

Vyhodnotenie reakcií oka je nevyhnutne subjektívne. Na podporu harmonizácie pri vyhodnotení reakcie oka a na pomoc testovacím laboratóriám a tým, ktorí sú zainteresovaní na uskutočňovaní a interpretovaní výsledkov, musia byť zamestnanci, ktorí uskutočňujú pozorovania, primerane vyškolení na používanie systému hodnotenia.

2. **ÚDAJE**

2.2. VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV

Vyhodnotenie podráždenia oka sa posúdi v súvislosti s charakterom a závažnosťou poškodení a ich reverzibilitou alebo ireverzibilitou. Jednotlivé stupne nepredstavujú absolútne kritérium pre dráždivé vlastnosti materiálu, keďže sa hodnotia aj iné účinky testovaného materiálu. Skôr je potrebné na jednotlivé stupne nazerať ako na referenčné hodnoty, ktoré majú zmysel iba vtedy, keď sú doložené celkovým opisom a posúdením všetkých vyšetrení.

▼B

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Zdôvodnenie pre *in vivo* testovanie: kritická analýza údajov z predchádzajúcich testov, vrátane výsledkov zo stratégie postupného testovania:

— opis dôležitých údajov dostupných z predchádzajúceho testovania,

— údaje získané v každom štádiu stratégie testovania,

— opis uskutočnených *in vitro* testov, vrátane údajov o postupoch, získaných výsledkov s testovanými/referenčnými látkami,

— opis *in vivo* uskutočnenej štúdie podráždenia/poleptania kože, vrátane získaných výsledkov,

— kritická analýza pre uskutočnenie *in vivo* štúdie.

Testovaná látka:

— identifikačné údaje (napr. číslo CAS; zdroj, čistota, známe nečistoty, číslo šarže),

— fyzikálny charakter a fyzikálno-chemické vlastnosti (napr. pH, prchavosť, rozpustnosť, stabilita, reaktivita s vodou),

— v prípade zmesi, zloženie a vzájomný percentuálny podiel zložiek,

— ak sa použije lokálne anestetikum, identifikácia, čistota, typ, dávka a prípadná interakcia s testovanou látkou.

Nosič:

— identifikácia, koncentrácia (v prípade potreby), použitý objem,

— zdôvodnenie výberu nosiča.

Pokusné zvieratá:

— použitý druh/kmeň, zdôvodnenie pre použitie iných zvierat ako králik – albín,

— vek každého zvieraťa na začiatku štúdie,

— počet zvierat každého pohlavia v testovaných a kontrolných skupinách (v prípade potreby),

— hmotnosti jednotlivých zvierat na začiatku a konci testu,

— zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo atď.

Výsledky:

— opis použitej metódy na hodnotenie podráždenia v každom čase vyšetrenia (napr. ručná štrbinová lampa, biomikroskop, fluorescein),

▼B

— tabuľkové spracovanie údajov o dráždivých/žieravých účinkoch pre každé zviera v každom čase vyšetrenia až do vylúčenia každého zvieraťa z testu,

— podrobný opis stupňa zisteného podráždenia alebo poleptania,

— opis všetkých pozorovaných poškodení oka (napr. vaskularizácia, vytvorenie panusu, sfarbenie),

— opis iných lokálnych a systémových nepriaznivých účinkov, ktoré sa nevyskytujú na oku, a prípadné histopatologické zistenia.

Diskusia k výsledkom.

3.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Extrapolácia výsledkov štúdií podráždenia oka u laboratórnych zvierat na ľudí je možná len v obmedzenej miere. V mnohých prípadoch je králik – albín citlivejší na látky, ktoré spôsobujú podráždenie alebo poleptanie oka, ako ľudia.

Pozornosť je potrebné venovať interpretácii údajov na vylúčenie podráždenia vyplývajúceho zo sekundárnej infekcie.

4. **ODKAZY**

(1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, L, Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410 – 429.

(2) de Silva, O., Cottin, M., Dami, N, Roguet, R, Catroux, P., Toufic, A., Sicard, C, Dossou, K.G., Gerner, I., Schlede, E., Spielmann, H, Gupta, K.C., Hill, RN. (1997) Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies. Food Chem. Toxicol 35, 159 – 164.

(3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999) A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161 – 177.

(4) Young, J.R, How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro, 2,* 19 – 26.

(5) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227 – 231.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, pp. 483 – 524.

(6a) Testovacia metóda B.40 Leptanie kože.

(7) Testovacia metóda B.4. Akútna toxicita: podráždenie/-poleptanie kože.

(8) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. V Solne, Švédsko, 22. – 24. januára 1996 (http://www. oecd. org/ehs/test/background. htm).

▼B

(9) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, potvrdený 28. spoločným zasadaním Výboru pre chemikálie a Pracovnej skupiny pre chemikálie, november 1998 (http://www. oecd. org/ehs/Class/HCL6. htm).

(10) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm).

▼B

Tabuľka I

STUPNE POŠKODENIA OKA

Rohovka

Nepriehľadnosť (opacita): stupeň zákalu (odčítava sa od najhustejšej oblasti) (*)	
Žiadna ulcerácia alebo nepriehľadnosť (opacita)	0
Roztrúsené alebo difúzne oblasti nepriehľadnosti (opacity) (iné ako ľahký zákal normálneho lesku); zreteľne viditeľné detaily dúhovky	1
Ľahko rozoznateľná priehľadná oblasť; detaily dúhovky mierne zakalené	2
Perleťová oblasť; neviditeľné detaily dúhovky, veľkosť zreničky ťažko rozoznateľná	3
Nepriehľadná rohovka; dúhovka nezistiteľná cez zákal	4

Maximálne možný: 4

POZNÁMKY

(*) Veľkosť nepriehľadnej oblasti rohovky sa zaznamená

Dúhovka

Normálna	0
Nápadne privreté riasy, prekrvenie, opuch, mierne prekrvenie okolo rohovky; alebo injektácia, dúhovka reaguje na svetlo (pomalá reakcia sa pokladá za pozitívnu)	1
Krvácanie, hrubé poškodenie, bez reakcie na svetlo	2

Maximálne možný: 2

Spojovky

Sčervenanie (týka sa palpebrálnych a bulbárnych spojoviek, bez rohovky a dúhovky)	
Normálne	0
Niektoré cievy prekrvené (injektované)	1
Difúzne karmínové zafarbenie, jednotlivé cievy ťažko rozoznateľné	2
Difúzna tmavá červeň	3

Maximálne možný: 3

Chemóza

Opuch (týka sa viečok a/alebo tretieho viečka)	
Normálne	0
Trocha opuchnuté nad normálom	1
Zreteľný opuch s čiastočným vyvrátením viečok	2
Opuch s polovičným uzavretím viečok	3
Opuch s väčším ako polovičným uzavretím viečok	4

Maximálne možný: 4

▼B

Príloha

Stratégia postupného testovania podráždenia a poleptania oka

VŠEOBECNÉ HĽADISKÁ

V záujme vedeckej spoľahlivosti a starostlivosti o zvieratá je dôležité zabrániť bezdôvodnému používaniu zvierat a minimalizovať testovanie, ktoré môže spôsobiť silné reakcie u zvierat. Všetky informácie o látke, ktoré sa týkajú jej potenciálu spôsobiť poleptanie/podráždenie oka, je potrebné posúdiť pred uvažovaní o použití *in vivo* testovania. Môžu už existovať dostatočné dôkazy na klasifikáciu testovanej látky, pokiaľ ide o jej potenciál spôsobiť poleptanie alebo podráždenie oka bez toho, aby bolo potrebné vykonať testovanie na laboratórnych zvieratách. Z tohto dôvodu použitie kritickej analýzy a stratégie postupného testovania minimalizuje potrebu *in vivo* testovania, najmä ak látka môže spôsobiť silné reakcie.

Odporúča sa, aby sa použila kritická analýza na posúdenie existujúcich informácií, týkajúcich sa podráždenia a poleptania oka látkami, a na stanovenie, či je potrebné vykonať ďalšie štúdie iné ako *in vivo* štúdie oka na umožnenie charakterizácie tohto potenciálu. Ak sú potrebné ďalšie štúdie, odporúča sa, aby sa na získanie príslušných experimentálnych údajov použila stratégia postupného testovania. V prípade látok, ktoré sa ešte netestovali, sa použije stratégia postupného testovania, aby sa získali údaje, potrebné na vyhodnotenie jej potenciálu spôsobiť poleptanie/podráždenie oka. Stratégia testovania, opísaná v tejto prílohe, bola vyvinutá na workshope OECD (1). Neskôr bola potvrdená a rozšírená v Harmonised Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances a potvrdená 28. spoločným zasadaním Výboru pre chemikálie a Pracovnej skupiny pre chemikálie v novembri 1998 (2).

Aj keď táto stratégia testovania nie je integrálnou súčasťou testovacej metódy B.5, vyjadruje odporúčaný prístup pre určovanie charakteristík podráždenia/-poleptania oka. Tento prístup predstavuje najlepší postup a aj etický štandard pre *in vivo* testovanie podráždenia/po leptanie oka. Testovacia metóda poskytuje usmernenie na vykonanie *in vivo* testu a sumarizuje faktory, ktoré je potrebné preskúmať pred začatím takéhoto testu. Stratégia postupného testovania poskytuje prístup na základe kritickej analýzy na vyhodnotenie existujúcich údajov o dráždivých/žieravých vlastnostiach látok pre oko a viacstupňový prístup na vytvorenie príslušných údajov o látkach, pre ktoré sú potrebné ďalšie štúdie, alebo pre ktoré sa ešte neuskutočnili žiadne štúdie. Stratégia zahrnuje vykonanie najskôr validovaných a uznaných *in vitro* alebo *ex vivo* testov a potom testovacej metódy B.4 štúdie poškodenia/poleptania kože v špecifických podmienkach (3)(4).

OPIS STRATÉGIE POSTUPNÉHO TESTOVANIA

Pred vykonaním testov ako súčasti stratégie postupného testovania (obrázok) sa posúdia všetky dostupné informácie na určenie, či je potrebné *in vivo* testovanie na oku. Aj keď by bolo možné získať významné informácie z hodnotenia jednotlivých parametrov (napr. extrémna hodnota pH), je potrebné posúdiť úplnosť existujúcich informácií. Všetky dôležité údaje o účinkoch príslušnej látky a jej štrukturálnych analógov sa vyhodnotia pri rozhodovaní na základe kritickej analýzy a uvedie zdôvodnenie rozhodnutia. Prednostne je potrebné zamerať sa na existujúce údaje o účinkoch látky na ľudí a zvieratá, za ktorými nasledujú výsledky z *in vitro* alebo *ex vivo* testovania. Vždy, keď je to možné, je potrebné zabrániť, aby sa uskutočňovali *in vivo* štúdie žieravých látok. Hodnotené faktory v stratégii testovania zahrnujú:

▼B

Vyhodnotenie existujúcich účinkov látky na ľudí a zvieratá (stupeň 1). Existujúce údaje o účinkoch na ľudí, napr. klinické štúdie alebo štúdie expozície na pracovisku a prípadové správy a/alebo údaje z testovania pri štúdiách na očiach na zvierat sa posúdia ako prvé, pretože poskytujú informácie priamo súvisiace s účinkami na oči. Potom sa posúdia dostupné údaje zo štúdií na ľuďoch a/alebo zvieratách, ktorými sa hodnotilo poleptanie/podráždenie kože. Látky, ktorých žieravé alebo silne dráždivé účinky na oko sú známe, sa neaplikujú do očí zvierat a ani tie látky, u ktorých je preukázané, že majú žieravé alebo dráždivé účinky na kožu, takéto látky by sa mali pokladať za žieravé a/alebo dráždivé aj na oči. Látky s dostatočnými dôkazmi o nežieravých a nedráždivých účinkoch z prechádzajúcich štúdií uskutočnených na očiach tiež už nie je potrebné testovať v *in vivo* štúdiách na očiach.

Analýza súvislostí medzi štruktúrou a aktivitou (ŠAR) (stupeň 2). Je potrebné posúdiť výsledky testovania štrukturálne príbuzných chemikálií, ak sú k dispozícii. Ak je k dispozícii dostatok údajov o účinkoch na ľudí a/alebo zvieratá o štrukturálne príbuzných látkach alebo zmesiach takýchto látok, z ktorých vyplývajú ich možné žieravé/dráždivé účinky na oči, dá sa predpokladať, že testovaná látka vyvolá rovnaké reakcie. V týchto prípadoch sa látka nemusí testovať. Negatívne údaje zo štúdií štrukturálne príbuzných látok alebo zmesí takýchto látok podľa stratégie postupného testovania neposkytujú dostatočný dôkaz o nežieravých/nedráždivých účinkoch látky. Validované a uznané prístupy ŠAR sa použijú na identifikáciu potenciálu spôsobiť poleptanie a podráždenie kože a očí.

Fyzikálno-chemické vlastnosti a chemická reaktivita (stupeň 3). Látky vykazujúce extrémne hodnoty pH ako $\leq 2,0$ a $\geq 11,5$ môžu mať veľmi silné lokálne účinky. Ak je extrémna hodnota pH základom pre identifikáciu látky, že spôsobuje poleptanie alebo podráždenie očí, potom sa tiež môže zohľadniť jej acidita/-alkalita (alebo tlmivá kapacita) (5) (6). Ak z tlmivej kapacity vyplýva, že látka *nemôže* spôsobiť poleptanie oka, potom je potrebné vykonať ďalšie testovanie na potvrdenie tejto domnienky, pričom sa pokiaľ možno použije validovaný a uznaný *in vitro* alebo *ex vivo* test (pozri oddiel stupeň 5 a 6).

Posúdenie ďalších existujúcich informácií (stupeň 4). V tomto stupni sa posúdia všetky dostupné informácie o systémovej toxicite dermálnou cestou. Tiež sa posúdi akútna dermálna toxicita testovanej látky. Ak sa testovaná látka prejavila ako veľmi toxická dermálnou cestou, nemusí sa testovať na oku. Aj keď bezpodmienečne neexistuje vzťah medzi akútnou dermálnou toxicitou a podráždením/-poleptaním oka, dá sa predpokladať, že ak je látka veľmi toxická dermálnou cestou, bude vykazovať vysokú toxicitu aj pri aplikácii do oka. Takéto údaje sa tiež môžu hodnotiť medzi stupňami 2 a 3.

Výsledky z in vitro alebo ex vivo testov (stupne 5 a 6). Látky, ktoré preukázali žieravé alebo silne dráždivé vlastnosti v *in vitro* alebo *ex vivo* teste (7) (8), ktoré boli validované a uznané na hodnotenie špecifických žieravých/dráždivých účinkov na oko alebo kožu, nie je potrebné testovať na zvieratách. Dá sa predpokladať, že takéto látky vyvolajú podobné závažné účinky *in vivo.* Ak nie sú k dispozícii validované a uznané *in vitro/ex vivo* testy, vynechajú sa stupne 5 a 6 a pristúpi sa priamo k stupňu 7.

Posúdenie in vivo dráždivých alebo žieravých účinkov látky na kožu (stupeň 7). Ak neexistuje dostatok dôkazov na vykonanie presvedčivej kritickej analýzy potenciálu látky spôsobiť podráždenie/poleptanie oka založených na údajoch z uvedených štúdií, je potrebné najskôr posúdiť *in vivo* potenciál spôsobiť podráždenie/poleptanie kože s použitím testovacej metódy B.4 (4) a k nej patriacej prílohy (9). Ak je o látke známe, že spôsobuje poleptanie alebo silné podráždenie kože, pokladá sa za látku so žieravými/dráždivými účinkami na oči, pokiaľ z iných informácií nevyplýva iný záver. Na základe toho nie je potrebné vykonať *in vivo* očný test. Ak látka nie je žieravá alebo silne dráždivá pre kožu, *in vivo* očný test je potrebné vykonať.

▼B

In vivo test na králikoch *(stupne 8 a 9)*. *In vivo* testovanie na očiach je potrebné začať počiatočným testom na jednom zvierati. Ak výsledky tohto testu preukážu, že látka je silne dráždivá alebo žieravá pre oči, nie je potrebné vykonať ďalšie testovanie. Ak sa nepreukážu žiadne žieravé alebo silne dráždivé účinky, uskutoční sa potvrdzujúci test na dvoch ďalších zvieratách.

ODKAZY

(1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. V Solne, Švédsko, 22. – 24. januára 1996 (http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm).

(2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, potvrdený 28. spoločným zasadaním Výboru pre chemikálie a Pracovnej skupiny pre chemikálie, november 1998 (http://www1.oecd.org/ehs/Class/-HCL6.htm).

(3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161 – 177.

(4) Testovacia metóda B.4. Akútna toxicita: podráždenie/poleptanie kože.

(5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. *In Vitro,* 2, 19 – 26.

(6) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227 – 231.

(7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, pp. 483 – 524.

(8) Testovacia metóda B.40 leptanie kože.

(9) Príloha k testovacej metóde B.4: Stratégia postupného testovania podráždenia a poleptania kože.

▼B

Obrázok

STRATÉGIA TESTOVANIA A HODNOTENIA PODRÁŽDENIA/POLEPTANIA OKA

	Činnosť	Zistenie	Záver
1	Existujúce údaje u ľudí a/alebo zvierat vykazujúce účinky na oči	Závažné poškodenie očí	Vrcholový konečný bod; látka sa posudzuje ako žieravá pre oči. Nie je potrebné ďalšie testovanie.
		Dráždivá pre oči	Vrcholový konečný bod; látka sa posudzuje ako dráždiví pre oči. Nie je potrebné ďalšie testovanie.
		Nežieravá a nedráždivá pre oči	Vrcholový konečný bod; látka sa posudzuje ako nežieravá alebo nedráždivá pre oči. Nie je potrebné ďalšie testovanie.
	Existujúce údaje u ľudí a/alebo zvierat vykazujúce žieravé účinky na kožu	Žieravá pre kožu	Látka sa pokladá za žieravú pre oči. Nie je potrebné ďalšie testovanie.
	Existujúce údaje u ľudí a/alebo zvierat vykazujúce silné dráždivé účinky na kožu	Látka silne dráždivá pre kožu	Látka sa pokladá za dráždivú pre oči. Nie je potrebné ďalšie testovanie.
	↓		
	Nie je dostupná žiadna informácia, alebo dostupná informácia alebo nepresvedčivá		
	↓		
2	Vykonajte ŠAR na posúdenie poleptania/podráždenia očí	Predpoklad vážneho poškodenia očí	Látka sa pokladá za žieravú pre oči. Nie je potrebné ďalšie testovanie.
		Predpoklad podráždenia očí	Látka sa pokladá za dráždivú pre oči. Nie je potrebné ďalšie testovanie.
	Vykonajte ŠAR na posúdenie poleptania kože	Predpoklad poleptania kože	Látka sa pokladá za žieravú pre oči. Nie je potrebné ďalšie testovanie.
	↓		
	Nedajú sa urobiť žiadne predpoklady alebo, alebo predpoklady sú nepresvedčivé alebo negatívne		
	↓		
3	Zmerajte pH (posúďte tlmivú kapacitu, ak je potrebné)	pH ≤ 2 alebo ≥ 11,5 (s vysokou tlmivou kapacitou, ak je potrebné)	Látka sa pokladá za žieravú pre oči. Nie je potrebné ďalšie testovanie.
	↓		
	2< pH < 11,5 alebo pH ≤ 2 alebo ≥ 11,5 s nízkou/žiadnou tlmivou kapacitou, ak je potrebné		
	↓		
4	Posúďte systémovú toxicitu dermálnou cestou	Veľmi toxická pri koncentráciách, ktoré by sa testovali na očiach	Látka by bola príliš toxická pre testovanie. Nie je potrebné ďalšie testovanie.
	↓		
	Takáto informácia nie je dostupná alebo látka nie je veľmi toxická		
	↓		

▼B

5	Vykonajte validovaný a uznaný *in vitro* alebo *ex vivo* test na poleptanie očí	Žieravá reakcia	Látka sa pokladá za žieravú pre oči. Nie je potrebné ďalšie testovanie.
	↓		
	Látka nie je žieravá alebo validovnné in vitro *alebo* ex vivo *testovacie metódy na poleptanie očí nie sú zatiaľ k dispozícii*		
	↓		
6	Vykonajte validovaný a uznaný *in vitro* alebo *ex vivo* test na podráždenie očí	Dráždivá reakcia	Látka sa pokladá za dráždivú pre oči. Nie je potrebné ďalšie testovanie.
	↓		
	Látka nie je dráždivá, alebo validované in vitro *alebo* ex vivo *testovacie metódy na podráždenie oči nie sú zatiaľk dispozícii*		
	↓		
7	Experimentálne posúďte *in vivo* potenciál podráždenia/poleptania (pozri testovaciu metódu B.4 vrátane jej prílohy)	Žieravá alebo silne dráždivá reakcia	Látka sa pokladá za žieravú pre oči. Nie je potrebné ďalšie testovanie.
	↓		
	Látka nie je žieravá alebo silne dráždivá pre kožu		
	↓		
8	Vykonajte počiatočný *in vivo* test na očiach na králikoch s použitím jedného zvieraťa	Závažne poškodenie oči	Látka sa posudzuje ako žieravá pre oči. Nie je potrebné ďalžie testovanie.
	↓		
	Žiadne závažné poškodenie alebo žiadna reakcia		
	↓		
9	Vykonajte potvrdzujúci test s použitím jedného alebo dvoch ďalších zvierat	Žieravá alebo dráždivá	Látka sa posudzuje ako žieravá alebo dráždivá pre oči. Nie je potrebné ďalšie testovanie.
		Nežieravá alebo nedráždivá	Látka sa posudzuje ako nedráždivá alebo nežieravá pre oči. Nie je potrebné ďalšie testovanie.

▼B

B.6. **PODRÁŽDENIE POKOŽKY**

1. **METÓDA**

1.1. ÚVOD

Poznámky:

Citlivosť a schopnosť testov zistiť potenciál senzibilizátorov ľudskej pokožky je považovaný v systéme klasifikácie toxicity dôležitej pre ľudské zdravie za dôležitý.

Neexistuje jednoduchá metóda testovania, ktorá by postačujúco rozpoznala všetky látky s potenciálom dráždenia ľudskej pokožky a ktorá by bola vhodná pre všetky látky.

Pri výbere testu sa berú do úvahy také faktory, ako sú fyzikálne vlastnosti látky, vrátane jej schopnosti prenikať do pokožky.

Skúšky s adjuvansom sú pravdepodobne presnejšie v predpovedi pravdepodobného senzibilizačného účinku na ľudskú pokožku ako metódy bez použitia Freundsovho kompletného adjuvansu, a preto sa im dáva prednosť.

Vyvinuli sa dva typy testov, pri ktorých sa používajú morčatá: testy s pomocnou látkou, v ktorých je alergický stav zosilňovaný rozpustením alebo suspendovaním látky v kompletnom Freundsovom adjuvanse (FCA), a testy bez pomocnej látky.

Často používaným typom adjuvansového testu je maximalizovaný test morčiat (GPMT). Hoci sa na zistenie potenciálu látky spôsobujúcej precitlivelosť pokožky používajú aj iné metódy, GPMT sa medzi adjuvansovými metódami uprednostňuje.

U väčšiny skupín chemikálií sa neadjuvansové metódy (uprednostňuje sa Buehlerov test) považujú za menej citlivé.

V určitých prípadoch môžu existovať príčiny pre výber Buehlerovho testu, v ktorom sa využíva miestne použitie namiesto intradermálneho vstrekovania využívaného maximalizovaným testom morčiat (GPMT). Pri použití Buehlerovho testu je nevyhnutné vedecké zdôvodnenie jeho použitia.

V tejto metóde je opísaný maximalizovaný test morčiat (GPMT) aj Buehlerov test. Iné metódy sa môžu použiť za predpokladu, že sú dostatočne overené a vedecky zdôvodnené.

Ak sa v screeningovom teste zistia pozitívne výsledky, látka sa navrhne ako potenciálny senzibilizátor a nie je potrebné uskutočniť ďalšie testovanie s morčatami. Ak sa v takomto teste zistia negatívne výsledky, je nutné uskutočniť test s morčatami použitím postupu opísaného v tejto testovacej metóde.

Pozri aj všeobecný úvod časť B.

▼B

1.2. DEFINÍCIE

Precitlivenosť pokožky: (alergická kontaktná dermatitída) je imunologicky sprostredkovaná kožná reakcia na látku. U človeka sú reakcie charakterizované svrbením, sčervenaním pokožky, edémami, bradavicami, vezikulami, bulami alebo ich kombináciou. U iných druhov môžu byť reakcie odlišné a môže sa spozorovať iba sčervenanie kože a edémy.

Indukcia expozície: experimentálna expozícia jedinca testovanou látkou s cieľom vyvolania precitlivelého stavu.

Doba indukcie: doba najmenej jeden týždeň nasledujúca po indukcii expozície, počas ktorej sa vyvinul precitlivelý stav.

Opakované vyvolanie reakcie expozíciou: experimentálna expozícia jedinca testovanou látkou nasledujúca po dobe indukcie. Zisťuje sa ňou, či jedinec reaguje hypersenzitívne.

1.3. ODPORÚČANÉ LÁTKY

Citlivosť a spoľahlivosť použitej experimentálnej metódy sa stanovuje každých šesť mesiacov použitím látok, u ktorých sú známe mierne účinky na precitlivenosť pokožky.

V správne riadených testoch sa očakáva u látok s miernymi účinkami na precitlivenosť pokožky prinajmenšom 30 % odozva v adjuvansovom teste a 15 % v neadjuvansovom teste.

Uprednostňujú sa nasledujúce látky:

CAS číslo	EINECS číslo	EINECS názov	Bežný názov
101-86-0	202-983-3	aldehyd kys. α-hexyl škoricovej	aldehyd kys. α-hexyl škoricovej
149-30-4	205-736-8	benzotiazol-2-tiol (merkaptobenzotiazol)	kaptax
94-09-7	202-303-5	benzokaín	nordkaín

Pri splnení horeuvedených kritérií sa za určitých okolností môžu použiť s primeraným zdôvodnením aj iné kontrolné látky.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Na začiatku sú testované zvieratá vystavené účinku testovanej látky intradermálnym vstrekovaním a/alebo epidermálnou aplikáciou (indukcia expozície). Nasleduje vyčkávacie obdobie perióda 10 až 14 dní (indukcia expozície), počas ktorej sa vyvíja imunitná odozva, a potom sa zvieratá vystavia účinku opakovanej dávky. U testovaných zvierat sa rozsah a stupeň reakcie pokožky pri opakovanej expozícii porovná s kontrolnými zvieratami, ktoré boli podrobené simulovanej aplikácii počas indukcie a bola na nich použitá opakovaná expozícia.

1.5. OPIS TESTOVACÍCH METÓD

Ak sa považuje za nevyhnutné odstrániť testovanú látku, uskutočňuje sa to vodou alebo vhodným rozpúšťadlom bez toho, aby sa tým zmenila už existujúca odozva, alebo aby bola porušená celistvosť pokožky.

▼B

1.5.1. *Maximalizovaný test morčiat (GPMT)*

1.5.1.1. P r í p r a v a

Mladé zdravé dospelé morčatá (albíny) sa aklimatizujú na laboratórne podmienky prinajmenšom počas 5-tich dní pred testom. Pred testom sú zvieratá náhodne pridelené do testovaných skupín. Srsť sa im v závislosti od použitej metódy ostrihá, oholí alebo chemicky depiluje. Je nutné chrániť pokožku pred obrúsením. Pred začatím testu a pri jeho ukončení sa zvieratá zvážia.

1.5.1.2. P o d m i e n k y t e s t o v a n i a

1.5.1.2.1. Testované zvieratá

Bežne sa používajú laboratórne kmene albínov morčiat.

1.5.1.2.2. Počet a pohlavie

Používajú sa samce a/alebo samice. Ak sa používajú samice musia to byť jedinci, ktoré zatiaľ nerodili, a nie sú tehotné.

V testovanej skupine sa používa minimálne 10 zvierat a v kontrolnej skupine 5 zvierat. Ak sa použije menej ako 20 testovaných a 10 kontrolných morčiat a nie je možné dôjsť k záveru, že testovaná látka je senzibilizátor, testuje sa s dodatočnými zvieratami, pričom sa výrazne doporučuje pracovať s minimálne 20 zvieratami v testovanej skupine a 10 zvieratami v kontrolnej skupine.

1.5.1.2.3. Hladiny dávok

Koncentrácia testovanej látky pri každej indukcii expozície musí byť systematicky tolerovaná a musí byť použitá najvyššia z dávok spôsobujúcich mierne podráždenie pokožky. Pri opakovanej expozícii sa používa najvyššia dávka nespôsobujúca podráždenie. Ak je to nevyhnutné, vhodné koncentrácie sa určia pri pilotnej štúdii používajúcej dve alebo tri zvieratá. Pri aplikácii sa používa kompletný Freundsov Adjuvans (FCA).

1.5.1.3. P o s t u p

1.5.1.3.1. Indukcia

Deň 0 – testovaná skupina

Na oblasť pleca zbaveného srsti sa použijú tri páry intradermálneho vstreknutia objemu 0,1 ml.

Vstrekovanie 1: zmes 1: 1 (v/v) FCA/voda alebo fyziologický roztok

Vstrekovanie 2: vybraná koncentrácia testovanej látky vo vhodnom nosiči

Vstrekovanie 3: vybraná koncentrácia testovanej látky zmiešaná so zmesou 1: 1 (v/v) FCA/voda alebo fyziologický roztok.

Pri 3. vstrekovaní sú rozpustné látky rozpustené vo vodnej fáze ešte pred zmiešaním s FCA. Lipofilné alebo nerozpustné látky sa suspendujú v FCA ešte pred spojením s vodnou fázou. Výsledná koncentrácia musí byť totožná s koncentráciou použitou pri 2. vstrekovaní.

▼B

Vstrekovania 1 a 2 sú prevedené blízko seba, a to čo najbližšie k hlave, zatiaľ čo vstrekovanie 3 sa prevedie kaudálnym smerom na testovanom povrchu.

Deň 0 – kontrolná skupina

Na to isté miesto ako u testovanej skupiny sa použijú tri páry intradermálneho vstreknutia objemu 0,1 ml.

Vstrekovanie 1: zmes 1: 1 (v/v) FCA/voda alebo fyziologický roztok

Vstrekovanie 2: neriedený nosič

Vstrekovanie 3: zmes 50 % v/v nosiča v zmesi 1: 1 (v/v) FCA/voda alebo fyziologický roztok.

Deň 5 – 7 – testovaná a kontrolná skupina.

V prípade látky, ktorá nedráždi pokožku, sa približne dvadsať štyri hodín pred uskutočnením indukcie pri lokálnom nanášaní testovaný povrch po ostrihaní a/alebo oholení ošetrí 0,5 ml 10 % sodnej soli sulfátu kyseliny laurovej vo vazelíne, čím sa lokálne podráždenie vyvolá.

Deň 6 – 8 – testovaná skupina

Na testovanej ploche sa opäť odstráni srsť. Filtračný papier (2 × 4 cm) zmáčaný testovanou látkou vo vhodnom nosiči sa priloží na testovaný povrch a počas 48 hodín sa udržuje s ním v kontakte pomocou nepriepustného obväzu alebo nepriepustného obalu.

Deň 6 – 8 – kontrolná skupina

Na testovanej ploche sa opäť odstráni srsť. Podobným spôsobom sa vhodný nosič priloží na testovaný povrch a počas 48 hodín sa udržuje v kontakte s ním pomocou nepriepustného obväzu alebo nepriepustného obalu.

1.5.1.3.2. Opakovaná aplikácia

Deň 20 – 22 – testovaná a kontrolná skupina

Z bokov testovaných a kontrolných zvierat sa odstráni srsť. Náplasť zmáčaná testovanou látkou sa použije na jeden bok zvierat, a ak je to potrebné, na druhý bok sa použije náplasť zmáčaná samotným nosičom. Náplasti sa počas 24 hodín udržujú v kontakte s testovaným povrchom pomocou nepriepustného obväzu alebo obalu.

1.5.1.3.3. Pozorovania a odstupňovanie odozvy: testovaná a kontrolná skupina

— približne 21 hodín po odstránení náplasti je testovaný povrch vyčistený, ostrihaný a/alebo vyholený a depilovaný, ak je to nevyhnutné,

— približne o 3 hodiny neskôr (približne 48 hodín po začatí opakovanej aplikácie) sa sleduje kožná reakcia a pozorovanie sa zaznamená podľa stupňov uvedených v dodatku,

— približne 24 hodín po tomto a druhom (72 hodín) pozorovaní sa pozorovanie uskutoční opäť a zaznamená sa.

Odporúča sa uskutočnenie slepého pokusu testovaných aj kontrolných zvierat.

Ak je potrebné potvrdiť výsledky získané opakovanou aplikáciou, uskutoční sa opätovná opakovaná aplikácia s použitím novej kontrolnej skupiny. Táto aplikácia sa prevádza približne jeden týždeň po prvej. Opätovná opakovaná aplikácia sa tiež prevádza s pôvodnou kontrolnou skupinou.

▼B

Všetky kožné reakcie a nezvyčajné nálezy, vrátane systémových reakcií, zistené pri metóde indukčnej aj opakovanej aplikácie je nutné zaznamenať podľa klasifikačnej škály Magnusson/Kligman (pozri dodatok). Pri objasňovaní nejednoznačných reakcií sa uskutočňujú ďalšie postupy, napríklad histopatologické vyšetrenie alebo meranie hrúbky zriasenia pokožky.

1.5.2. *Buehlerov test*

1.5.2.1. Príprava

Mladé zdravé dospelé morčatá (albíny) sa aklimatizujú na laboratórne podmienky prinajmenšom počas 5-tich dní pred testom. Pred testom sú zvieratá náhodne pridelené do testovaných skupín. Srsť sa im v závislosti od použitej metódy ostrihá, oholí alebo chemicky depiluje. Je nutné chrániť pokožku pred obrúsením. Pred začatím testu a pri jeho ukončení sa zvieratá zvážia.

1.5.2.2. Podmienky testovania

1.5.2.2.1. Testované zvieratá

Bežne sa používajú laboratórne kmene albínov morčiat.

1.5.2.2.2. Počet a pohlavie

Používajú sa samce a/alebo samice. Ak sa používajú samice, musia to byť jedince, ktoré zatiaľ nerodili a nie sú tehotné.

V testovanej skupine sa používa minimálne 20 zvierat a v kontrolnej skupine 10 zvierat.

1.5.2.2.3. Hladiny dávok

Pri každej indukcii expozície sa používa koncentrácia testovanej látky zodpovedajúca najvyššej dávke spôsobujúcej mierne, ale nie nadmerné podráždenie pokožky. Pri opakovanej expozícii sa používa najvyššia dávka nespôsobujúca podráždenie. Ak je to nevyhnutné, vhodné koncentrácie sa určia pri pilotnej štúdii, ktorá používa dve alebo tri zvieratá.

Pre testované látky rozpustné vo vode je vhodné použiť vodu alebo zriedený roztok zmáčadla ako nosiča. U iných testovaných materiálov sa uprednostňuje pri indukčnej aplikácii 80 % etanol/voda a pri opakovanej aplikácii acetón.

1.5.2.3. Postup

1.5.2.3.1. Indukcia

Deň 0 – testovaná skupina

Jeden bok je vyčistený od srsti (krátkym ostrihaním). Náplasti musia byť zmáčané testovanou látkou vo vhodnom nosiči (výber nosiča musí byť oprávnený; ak je to výhodné, môžu byť kvapalné testované látky použité neriedené).

Náplasť sa použije na testovaný povrch a počas 6 hodín sa udržuje s ním v kontakte pomocou vhodného obväzu alebo obalu.

▼B

Náplasti musia byť nepriepustné. Vhodné sú bavlnené vankúšiky buď kruhového, alebo štvorcového tvaru veľkosti približne 4 – 6 cm^2. Uprednostňuje sa zabezpečenie pohltenia použitím vhodných ochranných materiálov. Pri použití obväzovania je možné, že sa bude musieť použiť doplňujúca expozícia.

Deň 0 – kontrolná skupina

Jeden bok je vyčistený od srsti (krátkym ostrihaním). Použije sa iba nosič, a to obdobne ako pri kontrolnej skupine. Náplasť sa počas 6 hodín udržuje v kontakte s pokožkou pomocou nepriepustného obväzu alebo obalu. Ak je dokázané, že nie je nevyhnutné použiť simulovanú kontrolnú skupinu, používa sa obyčajná kontrolná skupina.

Deň 6 – 8 a 13 – 15 – testovaná a kontrolná skupina

Na tej istej testovanej ploche (ak je to potrebné, vyčistenej) toho istého boku sa používa tá istá aplikácia ako v 0. dni aj v 6. – 8. dni a aj v 13. – 15. dni.

1.5.2.3.2. Opakovaná aplikácia

Deň 27 – 29 – testovaná a kontrolná skupina

Netestovaný bok testovaných a kontrolných zvierat sa vyčistí od srsti (krátkym ostrihaním). Vhodné množstvo testovanej látky na nepriepustnom obväze alebo v obale sa použije na zadnú časť netestovaného boku testovaných a kontrolných zvierat. Používa sa maximálna koncentrácia, pri ktorej nedochádza k podráždeniu.

Ak je to vhodné, na predtým netestovanú časť boku testovaných aj kontrolných zvierat sa použije nepriepustná náplasť alebo obal s nosičom. Nepriepustná náplasť alebo obal prichytený vhodným obväzom sa udržuje v kontakte s pokožkou počas 6 hodín.

1.5.2.3.3. Pozorovania a odstupňovanie odozvy: testovaná a kontrolná skupina

— približne 21 hodín po odstránení náplasti je testovaný povrch opäť vyčistený od srsti,

— približne o 3 hodiny neskôr (asi 30 hodín po začatí opakovanej aplikácie) sa sleduje kožná reakcia a pozorovanie sa zaznamená podľa stupňov uvedených v dodatku,

— približne 24 hodín po predchádzajúcom pozorovaní (asi 54 hodín po opakovanej aplikácii) sa uskutoční ďalšie pozorovanie a opäť sa zaznamená.

Odporúča sa uskutočnenie slepého pokusu testovaných aj kontrolných zvierat.

Ak je potrebné potvrdiť výsledky získané prvou opakovanou aplikáciou, uskutoční sa druhá opakovaná aplikácia s použitím novej kontrolnej skupiny. Táto aplikácia sa prevádza približne jeden týždeň po prvej. Opätovná opakovaná aplikácia sa uskutočňuje tiež s pôvodnou kontrolnou skupinou.

▼B

Všetky kožné reakcie a nezvyčajné nálezy, vrátane systémových reakcií, zistené pri metóde indukčnej aj opakovanej aplikácii je nutné sledovať a zaznamenať podľa klasifikačnej škály Magnusson/-Kligman (pozri prílohu). Pri objasňovaní nejednoznačných reakcií sa uskutočňujú ďalšie postupy, napríklad histopatologické vyšetrenie alebo meranie hrúbky zriasenia pokožky.

2. **ÚDAJE (GPMT A BUEHLER)**

Všetky údaje musia byť zhrnuté v tabuľkovej forme s každou pozorovanou reakciou podráždenia pokožky zvieraťa.

3. **SPRÁVA (GPMT A BUEHLER)**

Ak sa pred testom morčiat uskutoční screeningová skúška, je potrebné uviesť spolu s výsledkami uskutočneného testu a odporúčanými testovacími látkami aj opis alebo odkaz na screeningovú skúšku (napríklad skúška lokálnych lymfatických uzlín (LLNA), test opuchnutia ucha u myší (MEST)), vrátane podrobností o postupoch.

Správa o teste (GPMT a Buehler)

Správa o teste má obsahovať, pokiaľ je to možné, nasledujúce informácie:

Testované zvieratá:

— kmeň použitých morčiat,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky bývania, strava atď.,

— individuálne hmotnosti zvierat na začiatku testu.

Podmienky testovania:

— metódu prípravy náplastí,

— podrobnosti o materiáli náplastí a technike ich použitia pri testovaní,

— výsledky pilotnej štúdie s vyhodnotením koncentrácií použitých pri indukčnej a opakovanej aplikácii,

— podrobnosti o príprave použitej látky, o jej aplikácii a odstránení,

— zdôvodnenie výberu nosiča,

— koncentrácie nosiča a testovanej látky použité pri indukčnej a opakovanej expozícii a celkové množstvo aplikovanej látky použitej pri indukcii aj opakovanej expozícii.

Výsledky:

— zostavenie tabuliek posledných výsledkov precitlivenosti a kontrole spoľahlivosti (pozri 1.3) vrátane informácií o testovanej látke, jej koncentrácii a nosiči,

▼B

— o každom zvierati vrátane systému stupňovania dávok,

— podrobný opis povahy a stupňa pozorovaných účinkov,

— histopatologické nálezy.

Diskusia

Záver

4. **ODKAZY**

Táto metóda je obdobná OECD TG 406.

▼B

Dodatok

TABUĽKA

Klasifikačná škála pre vyhodnotenie škodlivých účinkov vyvolaných škvŕn podľa Magnusson/Kligmana

0 = žiadne viditeľné zmeny

1 = nespojitý alebo škvrnitý erytém (sčervenanie kože)

2 = stredne silný a zlievajúci sa erytém

3 = intenzívny erytém a edém

▼M4

B.7. 28-DŇOVÁ ŠTÚDIA ORÁLNEJ TOXICITY PRI HLODAVCOCH/ TEST V OPAKOVANÝCH DÁVKACH

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s Usmerneniami OECD na vykonávanie testov TG 407 (2008). Pôvodné Usmernenia na vykonávanie testov 407 boli prijaté v roku 1981. V roku 1995 bola prijatá revidovaná verzia s cieľom získať ďalšie informácie pomocou zvierat použitých v štúdii, najmä informácie o neurotoxicite and imunotoxicite.

2. Organizácia OECD v roku 1998 iniciovala aktivitu s vysokou prioritou s cieľom zrevidovať existujúce usmernenia k testovaniu a vypracovať nové usmernenia k testovaniu potenciálnych endokrinných disruptorov (8). Jednou zložkou tejto aktivity bolo aktualizovať existujúce usmernenia OECD pre „28-dňovú štúdiu orálnej toxicity pri hlodavcoch/test v opakovaných dávkach“ (TG 407) podľa parametrov vhodných na zistenie endokrinného pôsobenia testovaných chemikálií. Tento postup bol podrobený rozsiahlemu medzinárodnému programu, ktorého účelom bolo otestovať význam a vykonateľnosť ďalších parametrov, výkonnosť týchto parametrov pri chemikáliách s (anti)estrogénnym, (anti)androgénnym a (anti)tyreoidným pôsobením, intralaboratórnu a interlaboratórnu reprodukovateľnosť a vzájomnú interferenciu nových parametrov s parametrami požadovanými v predchádzajúcom usmerňovacom dokumente TG 407. Týmto spôsobom sa zozbieralo veľké množstvo údajov, ktoré sa podrobne zhodnotili v súhrnnej správe OECD (9). Táto aktualizovaná testovacia metóda B.7 (rovnocenná s TG 407) bola vypracovaná na základe skúseností a výsledkov získaných počas medzinárodného programu testovania. Táto testovacia metóda umožňuje skúmanie súvislostí medzi určitými endokrinnými účinkami a inými toxikologickými účinkami.

ÚVODNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

3. Pri posudzovaní a vyhodnocovaní toxických charakteristík chemikálie možno po získaní prvotných informácií o toxicite prostredníctvom testovania akútnej toxicity pomocou opakovaných dávok stanoviť orálnu toxicitu. Táto testovacia metóda je zameraná na preskúmanie účinkov na veľmi širokej škále potenciálnych cieľov toxicity. Poskytuje informácie o možnej nebezpečnosti pre zdravie, ktorá sa pravdepodobne vyskytne pri opakovanej expozícii v priebehu pomerne krátkeho časového obdobia, vrátane účinkov na nervový, imunitný a endokrinný systém. Pokiaľ ide o tieto konkrétne sledované parametre, mali by sa pomocou nej identifikovať chemikálie s neurotoxickým potenciálom, čo môže viesť k ďalšiemu dôkladnému skúmaniu tohto aspektu, a chemikálie, ktoré majú vplyv na tyreoidnú fyziológiu. Takisto pomocou nej možno získať údaje o chemikáliách, ktoré majú vplyv na samčie a/alebo samičie rozmnožovacie orgány pri mladých dospelých zvieratách, a možno pomocou nej zistiť imunologické účinky.

4. Výsledky tejto testovacej metódy B.7 sa použijú na identifikáciu nebezpečnosti a na hodnotenie rizík. Výsledky získané pomocou parametrov súvisiacich s endokrinným systémom by sa mali posudzovať v kontexte Koncepčného rámca OECD na testovanie a hodnotenie chemikálií poškodzujúcich endokrinný systém (11). Metóda zahŕňa základnú štúdiu toxicity pri opakovaných dávkach, ktorú možno použiť v prípade chemikálií, pri ktorých nemožno zaručiť 90-dňovú štúdiu (napr. keď objem produkcie neprekračuje určité limity), alebo ako predbežnú štúdiu k dlhodobej štúdii. Interval expozície trvá 28 dní.

▼M4

5. Medzinárodný program uskutočnený na overenie parametrov vhodných na potenciálne odhalenie endokrinného pôsobenia testovanej chemikálie, ukázal, že kvalita údajov získaných touto testovacou metódou B.7 bude vo veľkej miere závisieť od skúseností testovacieho laboratória. Súvisí to najmä s histopatologickým stanovením cyklických zmien pri samičích rozmnožovacích orgánoch a so stanovením hmotnosti malých hormonálnych orgánov, ktorých pitva je náročná. Boli vypracované usmernenia k histopatológii (19), ktoré sú k dispozícii na verejnej webovej stránke OECD o usmerneniach k testovaniu. Ich cieľom je pomôcť patológom pri ich skúmaní a pomôcť zvýšiť citlivosť skúšky. Pri množstve parametrov sa zistilo, že indikujú endokrinnú toxicitu, na základe čoho boli začlenené do testovacej metódy. Parametre, pre ktoré nie sú k dispozícii dostatočné údaje na preukázanie ich užitočnosti alebo pri ktorých bol v rámci programu overovania preukázaný iba slabý prínos pri zisťovaní endokrinných disruptorov, sú navrhnuté ako nepovinné parametre (pozri dodatok 2).

6. Vzhľadom na údaje získané v rámci procesu overovania treba zdôrazniť, že táto štúdia nie je dostatočne citlivá na identifikáciu všetkých látok s (anti)androgénnymi alebo (anti)estrogénnymi účinkami (9). Testovacia metóda sa nevykonáva v životnej fáze, v ktorej je endokrinný systém najcitlivejší na poškodenie. Pomocou testovacej metódy sa však v priebehu procesu overovania identifikovali látky slabo alebo silno ovplyvňujúce funkciu štítnej žľazy a látky so silným a stredne silným účinkom na endokrinný systém, ktoré pôsobia na estrogénové alebo androgénové receptory. Na druhej strane vo väčšine prípadov nebolo možné identifikovať látky s účinkami na endokrinný systém, ktorých pôsobenie na estrogénové alebo androgénové receptory je slabé. Testovaciu metódu preto nemožno charakterizovať ako skríningový test endokrinného pôsobenia.

7. Neexistenciu účinkov súvisiacich s týmito druhmi pôsobenia následne nemožno brať ako dôkaz neexistencie účinkov na endokrinný systém. Pokiaľ ide o endokrinné účinky, charakterizácia látok by preto nemala byť založená iba na výsledkoch tejto testovacej metódy, ale mala by sa použiť v rámci prístupu váhy dôkazov, ktorý zohľadňuje všetky existujúce údaje o chemikálii na účely charakterizácie potenciálneho endokrinného pôsobenia. Z tohto dôvodu by regulačné rozhodovanie o endokrinnom pôsobení (charakterizácia látky) malo byť postavené na širokom základe a nemalo by sa opierať iba o výsledky aplikácie tejto testovacej metódy.

8. Uznáva sa, že všetky postupy využívajúce zvieratá musia byť v súlade s miestnymi normami starostlivosti o zvieratá. Opisy starostlivosti a zaobchádzania uvedené ďalej predstavujú minimálne normy pre vykonávanie postupov a v prípade, že miestne predpisy sú prísnejšie, budú mať miestne predpisy prednosť. Ďalšie usmernenia k humánnemu zaobchádzaniu so zvieratami uvádza organizácia OECD (14).

9. Vymedzenie pojmov je uvedené v dodatku 1.

PRINCÍP TESTU

10. Niekoľkým skupinám experimentálnych zvierat sa denne orálne podáva testovaná chemikália v odstupňovaných dávkach spôsobom, pri ktorom sa každej skupine podáva jedna dávka počas 28-dňovej periódy. Počas periódy podávania sa zvieratá pozorne pozorujú, pričom sa denne kontroluje prítomnosť znakov toxického účinku. Zvieratá, ktoré počas testu uhynú alebo sa utratia, sú následne pitvané a takisto zvieratá, ktoré prežijú, sú na záver testu

▼M4

utratené a podrobené pitve. 28-dňová štúdia poskytuje informácie o účinkoch orálnej expozície v opakovaných dávkach a môže poukázať na potrebu ďalších dlhodobejších štúdií. Takisto môže poskytnúť informácie o výbere koncentrácií na účely dlhodobejších štúdií. Údaje získané pomocou tejto testovacej metódy by mali umožniť charakterizáciu toxicity testovanej chemikálie na zistenie závislosti medzi dávkou a reakciou a na stanovenie hladiny bez pozorovaného nepriaznivého účinku (NOAEL).

OPIS METÓDY

Výber druhov zvierat

11. Uprednostňovanými hlodavcami sú potkany, aj keď sa môžu použiť aj iné hlodavce. Ak sa parametre uvedené v rámci tejto testovacej metódy B.7 skúmajú pri inom druhu hlodavcov, je potrebné uviesť podrobné odôvodnenie. Hoci z biologického hľadiska je hodnoverné, že iné druhy by reagovali na toxikanty podobným spôsobom ako potkany, použitie menších druhov môže mať za následok väčšiu variabilitu z dôvodu technických problémov pri pitve menších orgánov. V rámci medzinárodného programu overovania na zistenie endokrinných disruptorov sa použili iba potkany. Používajú sa mladé zdravé dospelé zvieratá bežne používaných laboratórnych kmeňov. Používajú sa samice, ktoré nikdy nevrhli mláďatá a sú negravidné. Dávkovanie sa musí začať čo najskôr po odstavení mláďat a skôr než zvieratá dovŕšia deväť týždňov. Na začiatku štúdie sú váhové odchýlky pri zvieratách minimálne a neprevyšujú ± 20 % priemernej váhy oboch pohlaví. Ak je štúdia opakovanej orálnej dávky predbežnou štúdiou dlhodobej štúdie, uprednostňuje sa používanie zvierat toho istého kmeňa a z toho istého zdroja v oboch štúdiách.

Umiestnenie a kŕmenie

12. Všetky postupy musia byť v súlade s miestnymi normami starostlivosti o laboratórne zvieratá. Teplota pokusnej miestnosti, kde sú zvieratá umiestnené, by mala byť 22 °C (± 3 °C). Aj keď by relatívna vlhkosť mala byť aspoň 30 %, a pokiaľ možno by nemala prevyšovať 70 % okrem obdobia počas čistenia miestnosti, cieľom je, aby relatívna vlhkosť dosahovala 50 – 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Výber krmiva môže byť ovplyvnený potrebou zabezpečiť vhodnú prímes testovanej chemikálie, keď sa podáva týmto spôsobom. Zvieratá by mali byť umiestnené spolu v malých skupinách rovnakého pohlavia. Zvieratá možno umiestniť samostatne, ak je to vedecky opodstatnené. Pokiaľ ide o umiestnenie skupín do klietok, v jednej klietke by nemalo byť viac ako päť zvierat.

13. Krmivo treba pravidelne analyzovať, aby sa zistilo, či neobsahuje kontaminanty. Vzorka krmiva by sa mala zachovať až do dokončenia správy.

Príprava zvierat

14. Zdravé, mladé, dospelé zvieratá sa náhodne rozdelia do kontrolných a pokusných skupín. Klietky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy vzhľadom na ich umiestnenie. Zvieratá sa jednotlivo označia. Zvieratá sa v klietkach aklimatizujú na laboratórne podmienky najmenej päť dní pred začatím testovacej štúdie.

Príprava dávok

15. Testovaná chemikália sa podáva cez sondu priamo do žalúdka alebo v potrave alebo v pitnej vode. Metóda orálneho podávania závisí od účelu štúdie a fyzikálnych, chemických a toxikokinetických vlastností testovanej chemikálie.

▼M4

16. Ak je to potrebné, testovaná chemikália sa rozpustí alebo suspenduje vo vhodnom nosiči. Odporúča sa, aby sa vždy, keď je to možné, najskôr zvážilo použitie vodného roztoku/suspenzie, potom roztoku/suspenzie v oleji (napr. kukuričnom oleji) a nakoniec prípadného roztoku v iných nosičoch. Charakteristiky toxicity nosičov iných ako voda musia byť známe. Určí sa stabilita testovanej chemikálie v nosiči.

POSTUP

Počet zvierat a ich pohlavie

17. Na každej hladine dávkovania sa použije prinajmenšom desať zvierat (päť samíc a päť samcov). Ak je v pláne utratiť nejaké zvieratá aj počas testu, počet by mal byť zvýšený o plánovaný počet zvierat, ktoré majú byť utratené pred ukončením štúdie. Treba zvážiť použitie ďalšej satelitnej skupiny desiatich zvierat (päť z každého pohlavia) ku kontrolnej skupine a ku skupine vystavenej najvyššej dávke na účely pozorovaní reverzibility, perzistencie alebo oneskorenia toxických účinkov, a to najmenej počas 14 dní po testovaní.

Dávkovanie

18. Zvyčajne sa používajú najmenej tri testovacie skupiny a jedna kontrolná skupina, ale v prípade, že sa na základe hodnotenia ostatných údajov nepredpokladajú účinky pri dávke 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň, môže sa vykonať limitný test. Ak nie sú k dispozícii vhodné údaje, môže sa vykonať štúdia na zistenie rozsahu (zvieratá toho istého kmeňa a z toho istého zdroja), aby sa ľahšie stanovili dávky, ktoré sa použijú. So zvieratami v kontrolnej skupine sa musí zaobchádzať takisto ako so zvieratami v testovaných skupinách, s výnimkou aplikovania testovanej chemikálie. Ak sa pri podávaní testovanej chemikálie používa nosič, kontrolná skupina dostane nosič v najvyššom používanom objeme.

19. Pri výbere hladín dávok sa berú do úvahy existujúce údaje o toxicite a (toxiko-)kinetike testovanej chemikálie a príbuzných chemikálií. Najvyššia dávka sa vyberá tak, aby indukovala toxické účinky, ale nespôsobovala uhynutie zvierat alebo vážne utrpenie. Podľa toho sa vyberá aj znižujúca sa postupnosť hladín dávok s cieľom určiť závislosť reakcie od dávky a stanoviť hodnotu NOAEL pri najnižšej hladine dávky. Intervaly dávkovania s faktorom dva až štyri sú často optimálne na stanovenie klesajúceho dávkovania a pridanie štvrtej pokusnej skupiny je často vhodnejšie ako používanie veľmi veľkých intervalov (napr. viac ako faktor 10) medzi dávkami.

20. Ak sa pozoruje všeobecná toxicita (napr. zníženie telesnej hmotnosti, účinky na pečeň, srdce, pľúca alebo obličky atď.) alebo iné zmeny, ktoré nemusia byť toxickou reakciou (napr. nižší príjem potravy, zväčšenie pečene), pozorované účinky na imunitné, neurologické alebo endokrinné citlivé parametre by sa mali interpretovať opatrne.

Limitný test

21. Ak sa zistí, že test pri jednej hladine najmenej 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti za deň, alebo rovnocenné množstvo v percentách v strave alebo v pitnej vode (založené na určení telesnej hmotnosti) nespôsobil pri testovaných zvieratách žiadne toxické príznaky, a ak sa toxické účinky neočakávajú ani na základe údajov štruktúrne príbuzných chemikálií, potom sa nepovažuje za nevyhnutné uskutočniť celú štúdiu s použitím troch hladín. Výnimkou je prípad, keď expozícia človeka indikuje potrebu skúmania na vyššej hladine, a vtedy sa používa limitný test.

▼M4

Podávanie dávok

22. Zvieratám sa podá dávka testovanej chemikálie každý deň sedem dní v týždni počas 28 dní. Ak je testovaná chemikália podávaná cez sondu, musí sa to realizovať v jednej dávke pre zviera za použitia žalúdočnej trubice alebo vhodnej intubačnej kanyly. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže jednorazovo podať, závisí od veľkosti pokusného zvieraťa. Objem nemá byť vyšší ako 1 ml/100 g telesnej hmotnosti, okrem vodných roztokov, keď sa môže použiť 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. S výnimkou dráždivých alebo žieravých chemikálií, ktoré zvyčajne pri vyšších koncentráciách spôsobia zhoršenie účinkov, variabilita v aplikovanom objeme sa minimalizuje tým, že sa koncentrácie upravia tak, aby sa zabezpečil stály objem vo všetkých dávkach.

23. V prípade chemikálií podávaných v potrave alebo pitnej vode je dôležité zabezpečiť, aby množstvá použitej testovanej chemikálie neinterferovali s normálnou výživovou a vodnou bilanciou. Ak je testovaná chemikália podávaná v potrave, môže sa použiť buď konštantná stravná koncentrácia (ppm) alebo konštantná úroveň dávkovania s ohľadom na telesnú hmotnosť zvierat; alternatívne používanie je potrebné špecifikovať. V prípade, keď sa chemikália podáva sondou, dávka sa podáva približne v rovnaký čas každý deň a prispôsobí sa podľa potreby, aby sa zachovala stála hladina dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť. Ak sa uskutoční predbežná štúdia pri opakovaných dávkach pred uskutočnením dlhodobej štúdie, je potrebné v oboch štúdiách použiť podobnú potravu.

Pozorovania

24. Pozorovanie trvá 28 dní. Zvieratá v satelitnej skupine, ktoré sa plánujú použiť pri ďalšom sledovaní, sa držia najmenej 14 dní bez akéhokoľvek podávania, aby bolo možné zistiť oneskorené toxické účinky alebo ich perzistenciu, alebo zotavenie sa po nich.

25. Najmenej raz denne je nutné uskutočniť všeobecné klinické pozorovania, najlepšie vždy v tom istom čase s ohľadom na časový vrchol očakávaných účinkov po podaní. Zaznamenáva sa zdravotný stav zvierat. Najmenej dvakrát denne si treba všímať chorobnosť a úmrtnosť zvierat.

26. Raz pred prvou expozíciou (je dovolené porovnanie jednotlivých zvierat medzi sebou) a potom najmenej raz týždenne sa uskutočňujú pri všetkých zvieratách podrobné klinické pozorovania. Uskutočňujú sa mimo domovských klietok v štandardnom priestore, pokiaľ možno, vždy v tom istom dennom čase. Musia byť pozorne zaznamenané, s použitím hodnotiaceho systému explicitne vymedzeného testovacím laboratóriom. Je potrebné zaistiť čo najmenšie zmeny testovacích podmienok a výhodné je, ak pozorovania vedie pozorovateľ, ktorý nepozná postup testovania. Medzi príznaky, ktoré je potrebné si všímať, patria zmeny na koži, srsti, očiach, sliznici, výskyt sekrécie, exkrécie a vegetatívnej aktivity (slzenie, piloerekcia, veľkosť zreničiek, nezvyčajné dýchanie), ale uvedené príznaky nie sú vyčerpávajúce. Zmeny v chôdzi, držaní tela a reakcii na zaobchádzanie, ako aj prítomnosť klonických alebo napätých pohybov, stereotypov (napr. opakované točenie sa), prílišné ošetrovanie sa alebo zvláštne správanie (napr. chôdza dozadu, sebaznetvorenie), sa takisto musia zaznamenať (2).

27. Vo štvrtom týždni expozície sa uskutočňuje určenie zmyslovej reaktivity podnecovanej odlišnými spôsobmi (2) (napríklad zvukovými, zrakovými a proprioceptívnymi podnetmi) (3) (4) (5), určenie sily zovretia (6) a určenie motorickej aktivity (7). Ďalšie podrobnosti o postupoch, ktoré môžu nasledovať, sú uvedené v príslušných odkazoch. Možno však použiť aj iné alternatívne postupy k postupom, ktoré tu boli opísané.

▼M4

28. Funkčné pozorovania v štvrtom týždni expozície sa nemusia uskutočniť, ak je štúdia uskutočňovaná ako predbežná štúdia subchronickej štúdie (90 dní). V tomto prípade sa funkčné pozorovania uskutočnia v nasledujúcej štúdii. Na druhej strane, dostupnosť údajov o funkčných pozorovaniach zo štúdie opakovanej dávky zvyšujú možnosť výberu úrovní dávkovaných v nasledujúcej subchronickej štúdii.

29. Výnimočne sa nemusia uskutočniť funkčné pozorovania ani pri skupinách, v ktorých sa inak preukážu toxické príznaky v takom rozsahu, že by mohli významne interferovať s uskutočnením funkčných testov.

30. Pri pitve možno stanoviť estrálny cyklus všetkých samíc (nepovinné) odobratím vaginálnych sterov. Tieto pozorovania poskytnú informácie o fáze estrálneho cyklu v čase utratenia a pomôžu pri histologickom hodnotení tkanív citlivých na estrogény [pozri usmernenia o histopatológii (19)].

Telesná hmotnosť a spotreba potravy/vody

31. Všetky zvieratá sa musia vážiť najmenej raz za týždeň. Meranie spotreby potravy sa robí najmenej raz za týždeň. Ak sa testovaná chemikália podáva vo vode na pitie, spotrebu vody je takisto potrebné merať aspoň raz za týždeň.

Hematológia

32. Na konci testovacieho obdobia sa uskutočňujú tieto hematologické testy: hematokrit, koncentrácia hemoglobínu, počet erytrocytov, retikulocyty, celkový a diferenciálny počet leukocytov, počet trombocytov a meranie času/potenciálu zrážanlivosti krvi. Medzi ďalšie stanovenia, ktoré sa uskutočňujú, ak testovaná chemikália alebo jej predpokladané metabolity majú oxidačné vlastnosti alebo ak existuje podozrenie, že majú oxidačné vlastnosti, patrí koncentrácia methemoglobínu a Heinzove telieska.

33. Vzorky krvi sa odoberajú zo stanoveného miesta tesne pred alebo počas postupu utratenia zvierat a uchovávajú sa za vhodných podmienok. Zvieratá sa noc pred utratením nekŕmia ([1]).

Klinická biochémia

34. Klinická biochémia skúma hlavné toxické účinky v tkanivách a najmä účinky na obličky a pečeň. Vyšetrenie sa uskutočňuje zo vzoriek krvi, ktoré sa odoberajú všetkým zvieratám tesne pred alebo počas postupu utratenia zvierat (okrem zvierat uhynutých a/alebo utratených pred dokončením štúdie). Vyšetrenie plazmy alebo séra zahŕňa sodík, draslík, glukózu, celkový cholesterol, močovinu, kreatinín, celkové proteíny a albumín, najmenej dva enzýmy indukujúce hepatocelulárne účinky (ako alanín-aminotransferáza, aspartát-aminotransferáza, alkalická fosfatáza, γ-glutamyl transpeptidáza a glutamát-dehydrogenáza) a žlčové kyseliny. Meranie ďalších enzýmov (hepatálneho alebo iného pôvodu) a bilirubínu môže za určitých okolností poskytnúť užitočné informácie.

35. Nepovinne sa nasledujúce zistenia v analýzach moču môžu vykonať počas posledného týždňa štúdie a použije sa časový zber objemu moču: vzhľad, objem, osmolalita alebo špecifická váha, pH, bielkoviny, glukóza a krv/krvné bunky.

([1]) Pri mnohých meraniach v sére a plazme, najmä glukózy, sa uprednostňuje nepodávanie potravy cez noc pred odberom. Hlavným dôvodom je zvýšenie pravdepodobnosti kolísania hodnôt ako nevyhnutný dôsledok prijímania potravy. Môže to viesť k zakrytiu jemnejších účinkov a sťaží to interpretáciu. Na druhej strane nočné postenie môže rušivo vplývať na celkový metabolizmus zvierat a čiastočne aj na štúdie výživy, a môže to rušiť aj dennú expozíciu testovanou chemikáliou. Ak sa použije nočné postenie, klinicko-biochemické vyšetrenie sa uskutočňuje po funkčných pozorovaniach v štvrtom týždni štúdie.

▼M4

36. Okrem toho by sa mali brať do úvahy aj štúdie na vyšetrovanie plazmových alebo sérových markerov v základných poškodených tkanivách. Ostatné zisťovanie je možné uskutočniť, ak poznáme vlastnosti testovanej chemikálie, ktoré môžu vplývať, alebo sa o nich predpokladá, že vplývajú na príbuzné metabolické profily zahrňujúce vápnik, fosfáty, triglyceridy, špecifické hormóny a cholínesterázu. Je ich potrebné identifikovať pre chemické látky v určitých skupinách alebo posúdiť prípad po prípade.

37. Hoci v medzinárodnom hodnotení sledovaných parametrov súvisiacich s endokrinným systémom nebolo možné jednoznačne preukázať jednoznačnú výhodu určenia hormónov štítnej žľazy (T3, T4) a TSH, je vhodné zachovať vzorky plazmy alebo séra na meranie T3, T4 a TSH (nepovinné), ak je indikovaný účinok na os hypofýza – štítna žľaza. Tieto vzorky možno na účely skladovania zmraziť na teplotu – 20 °C. Variabilitu a absolútne koncentrácie hormonálnych ukazovateľov môžu ovplyvniť tieto faktory:

— čas utratenia z dôvodu každodennej zmeny koncentrácií hormónov,

— metóda utratenia s cieľom zabrániť neprimeranému stresu pre zvieratá, ktorý môže ovplyvniť koncentrácie hormónov,

— súpravy na testovanie hormonálnych ukazovateľov, ktoré sa môžu líšiť štandardnými krivkami.

Definitívna identifikácia chemikálií s tyreoidnými účinkami je spoľahlivejšia na základe histopatologickej analýzy ako na základe hladín hormónov.

38. Vzorky plazmy špecificky určené na stanovenie hladiny hormónov sa odoberú počas porovnateľných denných časov. Odporúča sa, aby sa zohľadnilo stanovenie hladín T3, T4 a TSH ovplyvnených na základe zmien tyreoidnej histopatológie. Číselné hodnoty získané analýzou koncentrácií hormónov sa v prípade použitia rozličných komerčných testovacích súprav líšia. Následne nemusí byť možné zabezpečiť výkonnostné kritériá založené na jednotných historických údajoch. Laboratóriá by sa namiesto toho mali usilovať, aby boli kontrolné variačné koeficienty nižšie ako 25 v prípade T3 a T4 a nižšie ako 35 v prípade TSH. Všetky koncentrácie sa zaznamenajú v ng/ml.

39. Ak sú historické bazálne hodnoty nevhodné, zváži sa stanovenie premenných v oblasti hematológie a klinickej biochémie pred začatím dávkovania alebo podľa možnosti na skupine zvierat, ktoré neboli zaradené do pokusných skupín.

PATOLÓGIA

Makroskopická pitva

40. Všetky zvieratá v štúdii budú predmetom úplnej detailnej všeobecnej pitvy, ktorá zahŕňa pozorné vyšetrenie vonkajšieho povrchu tela, všetkých telesných otvorov a lebečnej, hrudnej, brušnej dutiny a ich obsahu. Pečeň, obličky, nadobličky, semenníky, nadsemenníky, prostata + semenné mechúriky s koagulačnými žľazami ako celok, týmus, slezina, mozog a srdce zo všetkých zvierat (okrem tých, ktoré chradnú, a/alebo zvierat, ktoré boli utratené pred ukončením štúdie) by sa mali pitvať na priľnavej tkanine a je potrebné čo najrýchlejšie zistiť ich mokrú hmotnosť skôr, ako pri pitve vyschnú. Orgány prostaty je nutné pitvať veľmi opatrne, aby sa zabránilo prepichnutiu semenných mechúrikov naplnených tekutinou. Semenné mechúriky a prostata sa prípadne môžu pitvať a vážiť aj po fixácii.

▼M4

41. Okrem toho sa nepovinne môžu čo najskôr, aby sa zabránilo vyschnutiu, odvážiť ďalšie dve tkanivá: párové vaječníky (mokrá váha) a maternica vrátane krčka maternice [usmernenie o odstránení a príprave maternicových tkanív na meranie hmotnosti sa uvádza v dokumente OECD TG 440 (18)].

42. Hmotnosť štítnej žľazy (nepovinné) sa môže určiť po fixácii. Úpravu je potrebné vykonať veľmi opatrne a až po fixácii, aby sa predišlo poškodeniu tkaniva. Poškodenie tkaniva by mohlo ohroziť histopatologickú analýzu.

43. Tieto tkanivá by sa mali uchovávať v čo najvhodnejšom fixačnom médiu na obidva typy tkanív a na neskoršie histopatologické vyšetrenie (pozri odsek 47): všetky makroskopické poškodenia, mozog (reprezentatívne oblasti vrátane veľkého mozgu, mozočka a mosta), miecha, oko, žalúdok, tenké a hrubé črevo (vrátane Peyerových plakov), pečeň, obličky, nadobličky, slezina, srdce, týmus, štítna žľaza, priedušnica a pľúca (uskladnené nafúknutím s fixačným prostriedkom a potom ponorením), gonády (semenníky a vaječníky), vedľajšie pohlavné orgány (maternica a krčok maternice, nadsemenníky, prostata + semenné mechúriky s koagulačnými žľazami), vagína, močový mechúr, lymfatické uzliny [okrem najbližšej odvodňovacej uzliny by sa mala odobrať ešte jedna lymfatická uzlina podľa praxe laboratória (15)], periférny nerv (sedací alebo tibiálny) podľa možnosti čo najbližšie k svalu, kostrový sval a kosť, s kostnou dreňou (prierez alebo čerstvo odobratá vzorka kostnej drene). Odporúča sa fixovať semenníky ponorením do Bouinovho alebo modifikovaného Davidsonovho fixačného prostriedku (16) (17). Obal tunica albuginea je potrebné opatrne a plytko prepichnúť ihlou na oboch stranách orgánu, aby sa umožnilo rýchle napustenie fixačným prostriedkom. Z klinických a iných nálezov môže vyplynúť potreba vyšetrenia ďalších následných tkanív. Takisto by sa mali zachovať všetky orgány, ktoré vzhľadom na známe vlastnosti testovanej chemikálie možno považovať za cieľové orgány.

44. Tieto tkanivá môžu poskytnúť cenné údaje o účinkoch na endokrinný systém: gonády (vaječníky a semenníky), vedľajšie pohlavné orgány (maternica vrátane krčka maternice, nadsemenníky, semenné mechúriky s koagulačnými žľazami, dorzolaterálna a ventrálna prostata), vagína, hypofýza, samčia prsná žľaza, štítna žľaza a nadoblička. Zmeny na samčích prsných žľazách nie sú dostatočne zdokumentované, ale tento parameter môže byť veľmi citlivý na látky s estrogénovým pôsobením. Pozorovanie orgánov/tkanív, ktoré nie sú vymenované v odseku 43, je nepovinné (pozri dodatok 2).

45. V Usmernení o histopatológii (19) sa uvádzajú ďalšie podrobnosti o pitvaní, fixácii, vykonávaní rezov a histopatológii endokrinných tkanív.

46. V rámci medzinárodného testovacieho programu boli získané dôkazy o tom, že nepatrné endokrinné účinky chemikálií s nízkou potenciou účinku na homeostázu pohlavných hormónov je možné určiť skôr na základe narušenia synchronizácie estrálneho cyklu v rôznych tkanivách a menej na základe zrejmých histopatologických zmien na samičích pohlavných orgánoch. Aj keď sa nezískal žiadny konečný dôkaz o takýchto účinkoch, pri interpretácii histopatológie vaječníkov (folikulárnych, tekálnych a granulóznych buniek), maternice, krčka maternice a vagíny sa odporúča brať do úvahy znaky možnej asynchrónnosti estrálneho cyklu. Ak sa hodnotí štádium cyklu podľa vaginálnych sterov, takisto ho možno zahrnúť do tohto porovnania.

▼M4

Histopatológia

47. Úplná histopatológia sa uskutoční na uskladnených orgánoch a tkanivách všetkých zvierat v kontrolnej skupine a v skupinách s vysokými dávkami. Tieto skúšky sa rozšíria o zvieratá zo všetkých skupín s odlišným dávkovaním, ak boli zistené zmeny v skupine s vysokými dávkami.

48. Preskúmajú sa všetky závažné poškodenia.

49. Ak boli použité satelitné skupiny, histopatológia sa vykoná na tkanivách a orgánoch, pri ktorých boli v testovaných skupinách zistené účinky.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

50. Je potrebné uviesť jednotlivé údaje. Navyše všetky údaje sa musia zhrnúť v tabuľkovej forme, pričom ukazujú pre každú testovanú skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat uhynutých počas testu alebo utratených z humánnych dôvodov, čas uhynutia alebo utratenia jednotlivých zvierat, počet zvierat, pri ktorých sa prejavili príznaky toxicity, opis pozorovaných príznakov toxicity vrátane nástupu, trvania a závažnosti toxických účinkov, počet zvierat vykazujúcich poškodenie, typy poškodení, ich závažnosť a percentuálne množstvo zvierat, pri ktorých sa prejavil daný typ poškodenia.

51. Ak je to možné, číselné výsledky sa vyhodnotia vhodnou a všeobecne akceptovateľnou štatistickou metódou. Porovnávanie účinkov podľa rozsahu dávkovania má zamedziť používaniu opakovaných t-testov. Štatistické metódy by sa mali vybrať počas prípravnej fázy štúdie.

52. Na účely kontroly kvality sa navrhuje, aby sa zozbierali historické kontrolné údaje a aby sa vypočítali variačné koeficienty pre číselné údaje, najmä pre parametre spojené s detekciou endokrinného disruptora. Tieto údaje sa môžu použiť pre porovnanie, keď sa vyhodnocujú jednotlivé štúdie.

Správa o teste

53. Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— fyzikálny charakter, čistota a fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikačné údaje.

Nosič (v prípade potreby):

— odôvodnenie výberu nosiča, ak je iný ako voda.

Testovacie zvieratá:

— použitý druh/kmeň,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo atď.,

— hmotnosti jednotlivých zvierat na začiatku testu,

— odôvodnenie výberu druhu, ak je iný ako potkan.

Podmienky testovania:

— odôvodnenie voľby úrovne dávok,

— údaje o príprave testovanej chemikálie/krmiva, dosiahnutých koncentráciách, stabilite a homogenite prípravku,

▼**M4**

— údaje o podávaní testovanej chemikálie,

— prepočet koncentrácie testovanej chemikálie v krmive/pitnej vode (ppm) na skutočnú dávku (mg/kg telesnej hmotnosti/deň), ak je to použiteľné,

— údaje o kvalite potravy a vody.

Nepovinné skúmané parametre

— zoznam nepovinných skúmaných parametrov.

Výsledky:

— telesná hmotnosť/zmeny telesnej hmotnosti,

— spotreba krmiva a spotreba vody, ak je to použiteľné,

— údaje o toxikologickej reakcii podľa pohlavia a úrovne dávky vrátane príznakov toxicity,

— povaha, závažnosť a trvanie klinických pozorovaní (s údajmi o reverzibilite),

— hodnotenie senzorickej aktivity, sily zovretia a motorickej aktivity,

— hematologické testy s významnými základnými hodnotami,

— testy klinickej biochémie s významnými základnými hodnotami,

— telesná hmotnosť pri utratení a údaje o hmotnosti orgánov,

— pitevné nálezy,

— podrobný opis všetkých histopatologických nálezov,

— absorpčné údaje, ak sú dostupné,

— štatistické spracovanie výsledkov v prípade potreby.

Rozbor výsledkov

Závery

▼M4

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Androgenicita je schopnosť chemikálie pôsobiť v organizme cicavcov ako prirodzený androgénny hormón (napr. testosterón).

Antiandrogenicita je schopnosť chemikálie potlačiť v organizme cicavcov pôsobenie prirodzeného androgénneho hormónu (napr. testosterónu).

Antiestrogenicita je schopnosť chemikálie potlačiť v organizme cicavcov pôsobenie prirodzeného estrogénového hormónu (napr. estradiol 17ß).

Antityreoidné pôsobenie je schopnosť látky potlačiť v organizme cicavcov pôsobenie prirodzeného hormónu štítnej žľazy (napr. T_3).

Dávkovanie je všeobecný pojem zahŕňajúci dávku látky, jej frekvenciu a trvanie podávania dávok.

Dávka je množstvo podanej testovanej chemikálie. Dávka je vyjadrená ako hmotnosť testovanej chemikálie na jednotku telesnej hmotnosti testovaného zvieraťa za deň (napr. mg/kg telesnej hmotnosti/deň) alebo ako konštantná koncentrácia v potrave.

Zjavná toxicita je všeobecný termín opisujúci jasné príznaky toxicity po podaní testovanej chemikálie. Tieto príznaky by mali postačovať na posúdenie nebezpečnosti a pri zvýšení podanej dávky by podľa nich malo byť možné predpokladať výskyt závažných príznakov toxicity a pravdepodobnej mortality.

NOAEL je skratka pre hladinu bez pozorovaného nepriaznivého účinku. Je to najvyššia úroveň dávky, pri ktorej po podaní testovanej chemikálie nie sú pozorované žiadne nepriaznivé nálezy.

Estrogenicita je schopnosť látky pôsobiť v organizme cicavcov ako prirodzený estrogénový hormón (napr. estradiol 17ß).

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Tyreoidné pôsobenie je schopnosť látky pôsobiť v organizme cicavcov ako prirodzený hormón štítnej žľazy (napr. T_3).

Validácia (overenie) je vedecký postup navrhnutý s cieľom opísať prevádzkové požiadavky a obmedzenia testovacej metódy a dokázať jej spoľahlivosť a významnosť pre konkrétny účel.

▼M4

Dodatok 2

Parametre odporúčané pre detekciu endokrinných disruptorov (ED) v rámci tejto testovacej metódy B.7

Povinné parametre	Nepovinné parametre
Hmotnosť	
— semenníky — nadsemenníky — nadobličky — prostata + semenné mechúriky s koagulačnými žľazami	— vaječníky — maternica vrátane krčka maternice — štítna žľaza
Histopatológia	
— gonády: — semenníky a — vaječníky — vedľajšie pohlavné orgány: — nadsemenníky — prostata + semenné mechúriky s koagulačnými žľazami — maternica vrátane krčka maternice — nadoblička — štítna žľaza — vagína	— vaginálne stery — samčie prsné žľazy — hypofýza
Meranie hormónov	
	— cirkulačné hladiny T3, T4 — cirkulačné hladiny TSH

LITERATÚRA

1. OECD (Paríž, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the ad hoc Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.

2. IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

3. Tupper, D. E., Wallace, R. B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: s. 999 – 1003.

4. Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health 9: s. 691 – 704.

5. Moser, V. C., McDaniel, K. M., Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: s. 267 – 283.

6. Meyer, O. A., Tilson, H. A., Byrd, W. C., Riley, M. T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: s. 233 – 236.

▼M4

7. Crofton, K. M., Howard, J. L., Moser, V. C., Gill, M. W., Reiter, L. W., Tilson, H. A., MacPhail, R. C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: s. 599 – 609.

8. OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10. – 11. marca 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.

9. OECD. (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No. 59, ENV/JM/MONO(2006)26.

10. OECD (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.

11. OECD (2012). Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.ht ml.

12. OECD (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.

13. OECD. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.

14. OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.

15. Haley, P., Perry, R., Ennulat, D., Frame, S., Johnson, C., Lapointe, J.-M., Nyska, A., Snyder, P. W., Walker, D., Walter, G. (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. Toxicol Pathol 33: s. 404 – 407.

16. Hess, R. A., Moore, B. J. (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: Methods in Reproductive Toxicology, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, s. 52 – 85.

17. Latendresse, J. R., Warbrittion, A. R., Jonassen, H., Creasy, D. M. (2002). Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. Toxicol. Pathol. 30, s. 524 – 533.

18. OECD (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals Nº440: Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties.

19. OECD (2009). Guidance Document 106 on Histologic evaluation of Endocrine and Reproductive Tests in Rodents ENV/JM/Mono(2009)11.

▼M4

B.8. SUBAKÚTNA INHALAČNÁ TOXICITA: 28-DŇOVÁ ŠTÚDIA

ZHRNUTIE

Táto revidovaná testovacia metóda B.8 bola vypracovaná s cieľom dôkladne opísať inhalačnú toxicitu testovanej chemikálie po opakovanej expozícii v obmedzenom časovom období (28 dní) a poskytnúť údaje pre kvantitatívne hodnotenie inhalačného rizika. Skupiny minimálne päť samcov a päť samíc hlodavcov sú na šesť hodín denne počas 28 dní exponované a) testovanej chemikálii pri troch alebo viacerých úrovniach koncentrácie; b) filtrovanému vzduchu (negatívna kontrola) a/alebo c) nosiču (kontrola pomocou nosiča). Zvieratá sú zvyčajne exponované päť dní v týždni, ale je povolená aj expozícia na sedem dní v týždni. Testujú sa vždy samce aj samice, môžu však byť vystavované rôznym úrovniam koncentrácie, ak je známe, že jedno z pohlaví je voči danej testovanej chemikálii vnímavejšie. Táto metóda poskytuje vedúcemu štúdie flexibilitu, aby mohol zahrnúť satelitné skupiny (reverzibilita), bronchoalveolárnu laváž (BAL), neurologické testy a doplnkové hodnotenia klinickej patológie a histopatologické hodnotenia s cieľom dôkladnejšie charakterizovať toxicitu testovanej chemikálie.

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s Usmerneniami OECD na vykonávanie testov TG 412 (2009). Pôvodné usmernenia na vykonávanie testov subakútnej inhalačnej toxicity 412 (TG 412) boli prijaté v roku 1981 (1). Táto testovacia metóda B.8 (ako rovnocenná verzia revidovaných usmernení TG 412) bola aktualizovaná, aby odrážala stav vedy a spĺňala súčasné a budúce regulačné potreby.

2. Táto metóda umožňuje opísať nepriaznivé účinky po opakovanej dennej inhalačnej expozícii testovanej chemikálii počas 28 dní. Údaje odvodené z 28-dňových štúdií subakútnej inhalačnej toxicity sa môžu použiť pri kvantitatívnom hodnotení rizík [ak nenasleduje 90-dňová štúdia subchronickej inhalačnej toxicity (kapitola B.29 tejto prílohy)]. Údaje môžu takisto poskytnúť informácie o výbere koncentrácií pre dlhodobejšie štúdie, ako je napríklad 90-dňová štúdia subchronickej inhalačnej toxicity. Táto testovacia metóda nie je špecificky určená na testovanie nanomateriálov. Vymedzenie pojmov použitých v súvislosti s touto testovacou metódou je uvedené na konci tejto kapitoly a v usmerňovacom dokumente 39 (2).

ÚVODNÉ ÚVAHY

3. Pred samotným vykonaním štúdie testovacie laboratórium zváži všetky dostupné informácie o testovanej chemikálii s cieľom zlepšiť kvalitu štúdie a minimalizovať využívanie zvierat. Informácie, ktoré môžu pomôcť pri výbere vhodných testovacích koncentrácií, zahŕňajú identitu, chemickú štruktúru a fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej chemikálie; výsledky všetkých testov toxicity *in vitro* alebo *in vivo*; predpokladané použitie (použitia) a potenciál pre expozíciu ľudí; dostupné údaje (Q)SAR, toxikologické údaje o štrukturálne príbuzných látkach a údaje odvodené z testov akútnej inhalačnej toxicity. Ak sa očakávajú alebo ak sa v priebehu štúdie objavia príznaky neurotoxicity, vedúci štúdie môže rozhodnúť o zahrnutí vhodných hodnotení, ako je napríklad funkčná pozorovacia batéria (FOB) a meranie motorickej aktivity. Aj keď je pri určitých testoch rozhodujúce načasovanie expozícií, tieto dodatočné činnosti nesmú narušiť základný plán štúdie.

▼M4

4. Riedenie žieravých alebo dráždivých testovaných chemikálií sa môže testovať pri koncentráciách, ktoré budú vykazovať želanú mieru toxicity [pozri dokument GD 39 (2)]. Pri vystavovaní zvierat pôsobeniu týchto materiálov musia byť cieľové koncentrácie dostatočne nízke, aby nespôsobovali výraznú bolesť ani utrpenie, a zároveň dostatočné na predĺženie krivky závislosti reakcie od koncentrácie na úroveň, na ktorej sa zabezpečí regulačný a vedecký cieľ testu. Tieto koncentrácie by sa mali vybrať v závislosti od jednotlivých prípadov, pokiaľ možno podľa vhodne navrhnutej štúdie na zistenie rozsahu, ktorá poskytuje informácie o kritickom parametri, každom prahu dráždivosti a čase nástupu príznakov (pozri odseky 11 – 13). Je potrebné zdôvodniť výber koncentrácie.

5. Moribundné zvieratá alebo zvieratá, ktoré majú očividne silné bolesti alebo vykazujú pretrvávajúce príznaky silného utrpenia, by sa mali humánnym spôsobom usmrtiť. Moribundné zvieratá sa posudzujú rovnako ako zvieratá, ktoré uhynú počas testovania. Kritériá na rozhodnutie usmrtiť moribundné alebo silne trpiace zvieratá a usmernenie o uznaní predvídateľnej alebo nastávajúcej smrti sú predmetom usmerňovacieho dokumentu OECD o humánnych parametroch (Humane Endpoints Guidance Document) (3).

OPIS METÓDY

Výber druhov zvierat

6. Používajú sa zdravé mladé dospelé hlodavce bežne používaných laboratórnych kmeňov. Preferovaným druhom je potkan. Použitie iných druhov je potrebné zdôvodniť.

Príprava zvierat

7. Používajú sa samice, ktoré nikdy nevrhli mláďatá a sú negravidné. V deň randomizácie majú byť zvieratá mladé dospelé jedince vo veku sedem až deväť týždňov. Telesná hmotnosť má byť v rozsahu ± 20 % priemernej hmotnosti každého pohlavia. Zvieratá sú náhodne vybraté, označené tak, aby sa umožnila jednotlivá identifikácia, a držia sa v klietkach aspoň päť dní pred začiatkom testu, aby sa im umožnila aklimatizácia na laboratórne podmienky.

Chov zvierat

8. Zvieratá musia byť jednotlivo identifikované, najlepšie pomocou podkožných transpondérov, aby sa zjednodušilo pozorovanie a zamedzilo zámenám. Teplota miestnosti, kde sa pokusné zviera chová, by mala byť 22 ± 3 °C. Relatívna vlhkosť by sa v ideálnom prípade mala udržiavať v rozsahu od 30 do 70 %, hoci to nemusí byť možné, ak sa ako nosič používa voda. Pred a po expozícii sú zvieratá zvyčajne umiestnené v klietkach v skupinách podľa pohlavia a koncentrácie, ale počet zvierat v jednej klietke by nemal prekážať bezproblémovému pozorovaniu každého zvieraťa, pričom by sa mali minimalizovať straty súvisiace so vzájomným požieraním alebo bojom jedincov. V prípade, že sa použije iba expozícia oblasti nosa, môže byť potrebné, aby sa zvieratá aklimatizovali na skúmavky obmedzujúce pohyb. Obmedzujúce skúmavky by nemali zvieratám spôsobovať neprimeraný stres súvisiaci s fyzikálnymi vlastnosťami, teplotou alebo obmedzením pohybu. Obmedzenie môže mať vplyv na fyziologické sledované parametre, ako sú telesná teplota (hypertermia) a/alebo respiračný minútový objem. Ak sú k dispozícii všeobecné údaje, podľa ktorých k takýmto zmenám nedochádza vo veľkej miere, potom obmedzujúce skúmavky nie je potrebné vopred upraviť. Zvieratá vystavené účinkom aerosólu celým telom by sa mali v priebehu expozície umiestniť samostatne, aby sa zabránilo filtrovaniu testovaného aerosólu cez srsť ostatných zvierat v klietke. S výnimkou času trvania expozície sa na kŕmenie môže používať bežné a osvedčené laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou miestnej pitnej vody. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy.

▼M4

Inhalačné komory

9. Pri výbere inhalačnej komory by sa mal vziať do úvahy charakter testovanej chemikálie a predmet testu. Uprednostňuje sa expozícia oblasti nosa (pričom tento pojem zahŕňa iba expozíciu hlavy, nosa alebo pysku). Vo všeobecnosti sa pri štúdiách kvapalných alebo tuhých aerosólov a pár, ktoré môžu kondenzovať a vytvárať aerosóly, uprednostňuje expozícia oblasti nosa. Špeciálne ciele štúdie možno lepšie dosiahnuť použitím expozície celého tela, ale tento krok je potrebné v správe o štúdii odôvodniť. Na zabezpečenie stability prostredia pri používaní komory na expozíciu celého tela by celkový objem testovaných zvierat nemal presiahnuť 5 % objemu komory. Princípy metód expozície celého tela a oblasti nosa a ich konkrétne výhody a nevýhody sú opísané v dokumente GD 39 (2).

ŠTÚDIE TOXICITY

Limitné koncentrácie

10. Na rozdiel od štúdií akútnej toxicity nie sú pre 28-dňové štúdie subakútnej inhalačnej toxicity stanovené žiadne limitné koncentrácie. Pri maximálnej testovanej koncentrácii je potrebné zvážiť: 1. maximálnu dosiahnuteľnú koncentráciu; 2. najhorší možný prípad úrovne expozície ľudí; 3. potrebu zachovať primeraný prísun kyslíka a/alebo 4. otázky týkajúce sa dobrých životných podmienok zvierat. V prípade chýbajúcich limitov založených na údajoch sa môžu použiť akútne limity podľa nariadenia (ES) č. 1272/2008 (13) (t. j. až do maximálnej koncentrácie 5 mg/l v prípade aerosólov, 20 mg/l v prípade pár a 20 000 ppm v prípade plynov); pozri dokument GD 39 (2). Ak je nutné prekročiť tieto limity pri testovaní plynov alebo vysokoprchavých testovaných chemikálií (napr. chladiace látky), je potrebné uviesť odôvodnenie. Z limitnej koncentrácie by sa mala vyvodiť jednoznačná toxicita bez toho, aby sa zvieratám spôsoboval neprimeraný stres alebo aby bola ovplyvnená dĺžka ich života (3).

Štúdia na zistenie rozsahu

11. Pred začiatkom základnej štúdie môže byť potrebné vykonať štúdiu na zistenie rozsahu. Štúdia na zistenie rozsahu je komplexnejšia ako predbežná štúdia, lebo sa neobmedzuje na výber koncentrácie. Poznatky získané zo štúdie na zistenie rozsahu môžu viesť k úspešnej základnej štúdii. Štúdia na zistenie rozsahu môže napríklad poskytnúť technické informácie o analytických metódach, rozdelení veľkosti častíc, odhalení toxických mechanizmov, klinickej patológii a histopatologických údajoch a odhadoch koncentrácií NOAEL a MTC v základnej štúdii. Vedúci štúdie sa môže rozhodnúť pre štúdiu na zistenie rozsahu s cieľom identifikovať prah dráždivosti dýchacích ciest (napr. histopatológiou dýchacích ciest, testovaním fungovania pľúc alebo bronchoalveolárnou lavážou), hornú koncentráciu tolerovanú bez toho, aby spôsobovala zvieratám neprimeraný stres, a parametre, ktoré najlepšie charakterizujú toxicitu testovanej chemikálie.

12. Štúdia na zistenie rozsahu môže pozostávať z jednej alebo viacerých úrovní koncentrácie. Každej úrovni koncentrácie by mali byť vystavené nie viac ako tri samce a tri samice. Štúdia na zistenie rozsahu by mala trvať minimálne päť dní a zvyčajne nie viac ako 14 dní. V správe o štúdii sa uvedú dôvody výberu koncentrácií pre základnú štúdiu. Cieľom základnej štúdie je preukázať vzťah koncentrácie a reakcie založený na parametri, ktorý je podľa očakávaní najcitlivejší. Nízka koncentrácia by mala ideálne predstavovať koncentráciu bez pozorovaného účinku, zatiaľ čo z vysokej koncentrácie by sa mala vyvodiť jednoznačná toxicita bez toho, aby sa zvieratám spôsoboval neprimeraný stres alebo aby bola ovplyvnená dĺžka ich života (3).

▼M4

13. Pri výbere úrovní koncentrácie pre štúdiu na zistenie rozsahu je potrebné zvážiť všetky dostupné informácie vrátane vzťahov štruktúry a aktivity a údajov o podobných látkach (pozri odsek 3). Štúdia na zistenie rozsahu môže potvrdiť/vyvrátiť parametre, ktoré sa považujú za najcitlivejšie mechanisticky založené parametre, napr. cholínesterázna inhibícia prostredníctvom organofosfátov, tvorba methemoglobínu prostredníctvom erytrocytotoxických činiteľov, hormóny štítnej žľazy (T_3, T_4) v prípade látok toxických pre štítnu žľazu, proteín, LDH alebo neutrofily pri bronchoalveolárnej laváži v prípade neškodných slabo rozpustných častíc alebo aerosólov dráždivých pre pľúca.

Základná štúdia

14. Základná štúdia subakútnej toxicity vo všeobecnosti pozostáva z troch úrovní koncentrácie a podľa potreby aj zo súbežných negatívnych (vzduchových) kontrol a/alebo kontrol nosiča (pozri odsek 17). Pri výbere vhodných úrovní expozície je potrebné použiť všetky dostupné údaje vrátane výsledkov štúdií systémovej toxicity, metabolizmu a kinetiky (osobitne treba dbať na to, aby sa nepoužívali vysoké úrovne koncentrácie, ktoré nasycujú kinetické procesy). Každá testovacia skupina je zložená aspoň z desiatich hlodavcov (piatich samcov a piatich samíc), ktoré sú exponované testovanej chemikálii šesť hodín denne päť dní v týždni počas štyroch týždňov (celkové trvanie štúdie 28 dní). Zvieratá môžu byť pôsobeniu chemikálie vystavené aj sedem dní v týždni (napr. pri testovaní inhalovaných liekov). Ak je o jednom z pohlaví známe, že je voči danej testovanej chemikálii vnímavejšie, môžu byť pohlavia vystavené rôznym úrovniam koncentrácie, aby sa optimalizovala reakcia na koncentráciu podľa opisu v odseku 15. Ak sa v prípade iných hlodavcov ako potkanov použije expozícia oblasti nosa, maximálne trvanie expozície je možné prispôsobiť s cieľom minimalizovať druhovo špecifické utrpenie. Pri použití intervalu expozície v trvaní menej ako šesť hodín denne, alebo ak je potrebné vykonať štúdiu expozície celého tela s dlhým intervalom (napr. 22 hodín denne), treba uviesť odôvodnenie [pozri dokument GD 39 (2)]. Počas trvania expozície by sa zviera nemalo kŕmiť, ak expozícia nepresiahne šesť hodín. V priebehu celej expozície celého tela sa zvieraťu môže podať voda.

15. Pomocou vybratých cieľových koncentrácií by sa mal identifikovať cieľový orgán (orgány) a preukázať zrejmá reakcia na koncentráciu:

— vysoká úroveň koncentrácie by mala mať za následok toxické účinky, ale nemala by spôsobiť pretrvávajúce príznaky ani letalitu, ktoré by znemožnili zmysluplné hodnotenie,

— stredná úroveň (úrovne) koncentrácie by sa mala podávať v takých odstupoch, aby viedla k stupňovaniu toxických účinkov medzi dávkami nízkej a vysokej koncentrácie,

— nízka úroveň koncentrácie by mala vyvolať malé alebo žiadne príznaky toxicity.

Satelitná štúdia (štúdia reverzibility)

16. Satelitná štúdia (štúdia reverzibility) sa môže použiť na pozorovanie reverzibility, pretrvávania alebo oneskoreného výskytu toxicity počas primerane dlhého obdobia po skončení testovania, najmenej však počas 14 dní. Satelitné skupiny (reverzibility) pozostávajú z piatich samcov a piatich samíc, ktoré sú exponované súbežne s pokusnými zvieratami v základnej štúdii. Skupiny satelitnej štúdie (reverzibility) sú vystavené pôsobeniu testovanej chemikálie pri najvyššej úrovni koncentrácie a súbežne sa podľa potreby vykonávajú vzduchové kontroly a/alebo kontroly nosiča (pozri odsek 17).

▼M4

Kontrolné zvieratá

17. S kontrolnými zvieratami súbežných negatívnych (vzduchových) kontrol sa zaobchádza rovnako ako so zvieratami testovacej skupiny s tou výnimkou, že sú vystavené filtrovanému vzduchu a nie testovanej chemikálii. Ak sa pri vytváraní testovacieho ovzdušia používa voda alebo iná látka, do štúdie je potrebné namiesto negatívnej (vzduchovej) kontrolnej skupiny zahrnúť kontrolnú skupinu nosiča. Vždy, keď je to možné, sa ako nosič použije voda. Ak sa ako nosič použije voda, kontrolné zvieratá by mali byť exponované vzduchu s rovnakou relatívnou vlhkosťou ako exponované skupiny exponované testovanej chemikálii. Výber vhodného nosiča by mal byť založený na primerane vykonanej predbežnej štúdii alebo na historických údajoch. Ak nie je toxicita nosiča dostatočne známa, vedúci štúdie sa môže rozhodnúť použiť negatívnu (vzduchovú) kontrolu aj kontrolu nosiča, ale tento postup sa vyslovene neodporúča. Ak z historických údajov vyplýva, že nosič nie je toxický, negatívna (vzduchová) kontrolná skupina nie je potrebná a mala by sa použiť iba kontrola nosiča. Ak sa pri predbežnej štúdii testovanej chemikálie pripravenej v nosiči nezistí žiadna toxicita, znamená to, že nosič pri testovanej koncentrácii nie je toxický a táto kontrola nosiča by sa mala použiť.

PODMIENKY EXPOZÍCIE

Podávanie koncentrácií

18. Zvieratá sú vystavené pôsobeniu testovanej chemikálie vo forme plynu, pary, aerosólu alebo ich kombinácie. Fyzikálne skupenstvo, ktoré sa testuje, závisí od fyzikálno-chemických vlastností testovanej chemikálie, zvolenej koncentrácie a/alebo najpravdepodobnejšej fyzikálnej formy pri manipulácii a používaní testovanej chemikálie. Hygroskopické a chemicky reaktívne testované chemikálie by sa mali testovať v podmienkach suchého vzduchu. Treba dbať na to, aby sa nevytvorili výbušné koncentrácie. Tuhé materiály môžu byť podrobené mechanickým procesom na zmenšenie veľkosti častíc. Ďalšie usmernenia sa nachádzajú v dokumente GD 39 (2).

Rozdelenie veľkosti častíc

19. Častice my sa mali rozdeliť podľa veľkosti v prípade všetkých aerosólov a pár, ktoré môžu kondenzovať a vytvárať aerosóly. Na umožnenie expozície všetkých relevantných oblastí dýchacej sústavy sa odporúčajú aerosóly so stredným aerodynamickým hmotnostným priemerom (MMAD) v rozsahu od 1 do 3 μm so štandardnou odchýlkou geometrického priemeru (σ_g) v rozsahu od 1,5 do 3,0 (4). Hoci by sa malo vynaložiť primerané úsilie na dodržanie tejto normy, pokiaľ túto podmienku nie je možné splniť, treba predložiť odborný posudok. Napríklad v prípade kovových dymov môžu byť častice menšie, ako stanovuje táto norma, a nabité častice a vlákna môžu túto normu prekračovať.

Príprava testovanej chemikálie v nosiči

20. V ideálnom prípade sa testovaná chemikália testuje bez nosiča. Ak je nevyhnutné použiť nosič, aby sa dosiahla vhodná koncentrácia a veľkosť častíc testovanej chemikálie, uprednostňuje sa voda. Vždy, keď je testovaná chemikália rozpustená v nosiči, je potrebné preukázať jej stabilitu.

MONITOROVANIE PODMIENOK EXPOZÍCIE

Prúdenie vzduchu v komore

21. Prúdenie vzduchu cez expozičnú komoru by sa počas každej expozície malo dôkladne kontrolovať, nepretržite monitorovať a zaznamenávať aspoň raz za hodinu. Monitorovanie koncentrácie testovacieho ovzdušia v reálnom čase (alebo dočasnej stability) je integrálne meranie všetkých dynamických parametrov a poskytuje nepriamy prostriedok kontroly všetkých relevantných dynamických inhalačných parametrov. Ak sa koncentrácia monitoruje v reálnom čase, frekvencia meraní prúdenia vzduchu sa môže obmedziť

▼M4

na jedno meranie na expozíciu za deň. Je potrebné venovať osobitnú pozornosť tomu, aby v komorách na expozíciu oblasti nosa nedochádzalo k opätovnému vdychovaniu. Koncentrácia kyslíka by mala byť minimálne 19 % a koncentrácia oxidu uhličitého by nemala presiahnuť 1 %. Ak existuje dôvod domnievať sa, že túto normu nie je možné splniť, koncentrácie kyslíka a oxidu uhličitého by sa mali zmerať. Ak merania v prvý deň expozície preukážu, že úrovne týchto plynov sú správne, ďalšie merania nie sú nutné.

Teplota komory a relatívna vlhkosť

22. Teplotu v komore je potrebné udržiavať na úrovni 22 ± 3 °C. Relatívnu vlhkosť v dýchacej zóne zvierat pri expozícii oblasti nosa aj pri expozícii celého tela je potrebné počas každej expozície nepretržite monitorovať a podľa možnosti raz za hodinu zaznamenávať. Relatívna vlhkosť by sa podľa možnosti mala udržiavať v rozsahu od 30 do 70 %, ale môže sa stať, že táto hodnota bude nedosiahnuteľná (napr. v prípade testovania zmesí na báze vody) alebo nemerateľná z dôvodu interferencie testovanej chemikálie a testovacej metódy.

Testovaná chemikália: nominálna koncentrácia

23. Vždy, keď je to možné, by sa mala vypočítať a zaznamenať nominálna koncentrácia expozície v komore. Nominálna koncentrácia je hmotnosť vytvorenej testovanej chemikálie vydelená celkovým objemom vzduchu, ktorý prešiel systémom inhalačnej komory. Nominálna koncentrácia sa nepoužíva na charakterizáciu expozície zvierat, ale porovnanie nominálnej a skutočnej koncentrácie vypovedá o účinnosti vytvárania testovacieho systému, a teda sa môže použiť na zistenie problémov s tvorbou.

Testovaná chemikália: skutočná koncentrácia

24. Skutočná koncentrácia je koncentrácia testovanej chemikálie odobratej z dýchacej zóny zvierat v inhalačnej komore. Skutočné koncentrácie možno získať špecifickými metódami (napr. priamym odberom vzorky, adsorpčnými alebo chemicky reaktívnymi metódami a následnou analytickou charakterizáciou) alebo nešpecifickými metódami, ako je gravimetrická filtrová analýza. Použitie gravimetrickej analýzy je prípustné iba v prípade jednozložkových práškových aerosólov alebo aerosólov kvapalín s nízkou prchavosťou, pričom je potrebné túto analýzu podložiť primeranými testovými charakterizáciami predbežných štúdií týkajúcich sa konkrétnej chemikálie. Koncentráciu viaczložkových práškových aerosólov takisto možno stanoviť prostredníctvom gravimetrickej analýzy. V tom prípade sú však potrebné analytické údaje, ktoré dokazujú, že zloženie materiálu vo vzduchu je podobné ako zloženie východiskového materiálu. Ak tieto informácie nie sú dostupné, môže byť potrebná opätovná analýza testovanej chemikálie (ideálne v jej skupenstve v ovzduší) v pravidelných intervaloch v priebehu štúdie. V prípade aerosólových látok, ktoré sa môžu vyparіť alebo môžu sublimovať, by sa malo preukázať, že všetky fázy sa zhromaždili pomocou zvolenej metódy.

25. Ak je to možné, počas celej štúdie by sa mala použiť jedna dávka testovanej chemikálie, pričom testovaná vzorka by sa mala uskladniť za podmienok, za ktorých sa zachová jej čistota, homogenita a stabilita. Pred začatím štúdie by mala byť k dispozícii charakterizácia testovanej chemikálie vrátane jej čistoty a, ak je to technicky možné, identity a množstiev identifikovaných kontaminantov a prímesí. Charakterizáciu možno preukázať napríklad týmito údajmi: retenčný čas a relatívna plocha píku, molekulová hmotnosť získaná pomocou analýzy hmotnostnej spektrometrie alebo plynovej chromatografie alebo iné odhady. Hoci za identitu testovanej vzorky testovacie laboratórium nenesie zodpovednosť, je vhodné, aby testovacie laboratórium aspoň čiastočne potvrdilo charakterizáciu poskytnutú dodávateľom (napr. farbu, fyzikálne skupenstvo atď.).

▼M4

26. Podľa možnosti je potrebné udržiavať ovzdušie pri expozícii konštantné. Na preukázanie stability podmienok expozície sa môže použiť zariadenie na monitorovanie v reálnom čase, ako napríklad aerosólový fotometer pre aerosóly alebo komplexný uhľovodíkový analyzátor pre pary. Skutočná koncentrácia v komore by sa mala merať aspoň tri razy v každý deň expozície a pri každej úrovni expozície. Ak to pre nízky prietok vzduchu alebo nízke koncentrácie nie je možné, je prijateľný jeden odber vzorky počas intervalu expozície. V takom prípade by sa mala táto vzorka podľa možnosti odoberať za celé trvanie expozície. Jednotlivé vzorky koncentrácie v komore by sa nemali od strednej koncentrácie v komore odchýliť o viac ako ± 10 % v prípade plynov a pár a o viac ako ± 20 % v prípade kvapalných alebo tuhých aerosólov. Čas na dosiahnutie rovnováhy v komore (t_{95}) by sa mal vypočítať a mala by o ňom podať správa. Interval expozície zahŕňa čas, keď sa testovaná chemikália tvorí. Zohľadňuje sa pri tom čas potrebný na dosiahnutie rovnováhy v komore (t_{95}) a čas rozpadu. Usmernenia k odhadovaniu t_{95} sú uvedené v dokumente GD 39 (2).

27. V prípade veľmi komplexných zmesí tvorených plynmi/parami a aerosólov (napr. spaľovacieho ovzdušia a testovaných chemikálií poháňaných účelovými výrobkami/zariadeniami koncového použitia) sa v inhalačnej komore môže každá fáza správať inak. Preto by sa pre každú fázu (plyn/para a aerosól) mala vybrať aspoň jedna látka slúžiaca ako ukazovateľ (analyt), obyčajne hlavná aktívna látka v zmesi. Ak je testovaná chemikália zmes, v správe by sa mala uviesť analytická koncentrácia celej zmesi, nielen aktívnej látky alebo látky slúžiacej ako ukazovateľ (analyt). Ďalšie informácie týkajúce sa skutočných koncentrácií sú uvedené v dokumente GD 39 (2).

Testovaná chemikália: rozdelenie veľkosti častíc

28. Rozdelenie veľkosti častíc aerosólov by sa pri každej úrovni koncentrácie malo stanoviť aspoň raz za týždeň, a to pomocou kaskádového impaktora alebo alternatívneho prístroja, ako je napríklad aerodynamický spektrometer častíc (APS). Ak možno preukázať rovnocennosť výsledkov získaných pomocou kaskádového impaktora a alternatívneho prístroja, potom sa alternatívny prístroj môže používať počas celej štúdie.

29. Druhé zariadenie, ako je gravimetrický filter alebo impinger/premývačka, by sa malo použiť súbežne s hlavným prístrojom na potvrdenie zachytávacej účinnosti hlavného prístroja. Hmotnostná koncentrácia získaná analýzou veľkosti častíc by mala byť v rozsahu primeraných limitov hmotnostnej koncentrácie získanej filtrovou analýzou [pozri dokument GD 39 (2)]. Ak možno preukázať rovnocennosť pri všetkých koncentráciách testovaných v počiatočnej fáze štúdie, nie je potrebné vykonávať ďalšie potvrdzujúce merania. V záujme zabezpečenia dobrých životných podmienok pre zvieratá by sa mali prijať opatrenia na minimalizáciu nejednoznačných údajov, ktoré môžu viesť k potrebe opakovať štúdiu.

30. Rozdelenie veľkosti častíc by sa malo vykonať v prípade pár, ak existuje možnosť, že kondenzácia pary môže mať za následok tvorbu aerosólu, alebo ak sa v ovzduší pár zistia častice s potenciálom zmiešaných fáz.

POZOROVANIA

31. Zvieratá by sa mali pred, počas a po skončení expozície klinicky pozorovať. V závislosti od reakcie zvierat počas expozície môžu byť potrebné častejšie pozorovania. Ak pozorovaniu zvierat bráni používanie skúmaviek obmedzujúcich pohyb zvierat, slabo osvetlených komôr na expozíciu celého tela alebo nepriehľadné ovzdušie, zvieratá by sa mali dôkladne preskúmať po skončení expozície. Na základe pozorovaní pred expozíciou v nasledujúcom dni možno zhodnotiť akúkoľvek reverzibilitu alebo zhoršenie toxických účinkov.

▼M4

32. Všetky pozorovania sa zaznamenávajú, pričom každé zviera má individuálny záznam. Keď sa zvieratá usmrtia z humánnych dôvodov alebo sa nájdu uhynuté, je potrebné čo možno najpresnejšie zaznamenať čas uhynutia.

33. Pozorovania v klietkach sa zameriavajú na zmeny kože a srsti, očí, slizníc, dýchania a krvného obehu, zmeny nervového systému, somatomotoriky a správania. Pozornosť sa zameriava na pozorovanie triašky, kŕčov, slinenia, hnačky, letargie, spánku a kómy. Meraním rektálnej teploty možno získať dôkazy svedčiace o reflexnej bradypney alebo hypo/hypertermii, ktoré súvisia s testovaním alebo s obmedzením pohybu. Protokol o štúdii môže zahŕňať ďalšie hodnotenia, ako je napríklad kinetika, biomonitorovanie, funkcia pľúc, zadržiavanie slabo rozpustných materiálov, ktoré sa hromadia v pľúcnom tkanive, a zmeny správania.

TELESNÉ HMOTNOSTI

34. Hmotnosť jednotlivých zvierat je potrebné zaznamenať krátko pred prvou expozíciou (deň 0), potom dvakrát týždenne (napríklad: piatky a pondelky, aby sa preukázalo zotavenie po víkende bez expozícií, alebo v časovom intervale, ktorý umožňuje hodnotenie systémovej toxicity) a v čase uhynutia alebo utratenia. Ak sa v prvých dvoch týždňoch neobjavia žiadne účinky, po zvyšok štúdie sa môže telesná hmotnosť merať raz za týždeň. Satelitné zvieratá (na štúdiu reverzibility, ak sa použijú) sa naďalej vážia raz za týždeň počas celého obdobia zotavovania. Na konci štúdie by sa všetky zvieratá mali krátko pred utratením odvážiť, aby sa získali neskreslené vypočítané pomery hmotnosti orgánov k telu.

SPOTREBA POTRAVY A VODY

35. Spotreba potravy by sa mala merať raz za týždeň. Môže sa merať aj spotreba vody.

KLINICKÁ PATOLÓGIA

36. Hodnotenia klinickej patológie sa po utratení vykonávajú pri všetkých zvieratách vrátane kontrolných a satelitných zvierat. Je potrebné zaznamenať časový interval medzi skončením expozície a odberom krvi, najmä ak je rekonštitúcia sledovaného parametra rýchla. Odber vzoriek po skončení expozície je indikovaný pri tých parametroch, ktoré majú krátky biologický polčas v plazme (napr. COHb, CHE a MetHb).

37. V tabuľke 1 sa uvádza zoznam parametrov klinickej patológie, ktoré sa vo všeobecnosti požadujú pri všetkých toxikologických štúdiách. Rozbor moču sa bežne nevyžaduje, ale môže sa vykonať, ak sa na základe očakávanej alebo pozorovanej toxicity predpokladá, že bude užitočný. Vedúci štúdie sa môže rozhodnúť hodnotiť ďalšie parametre s cieľom lepšie charakterizovať toxicitu testovanej chemikálie (napr. cholínesteráza, lipidy, hormóny, acidobázická rovnováha, methemoglobín alebo Heinzove telieska, kreatinkináza, pomer myelocytov a erytrocytov, troponíny, plyny v arteriálnej krvi, laktátdehydrogenáza, sorbitol-dehydrogenáza, glutamát-dehydrogenáza a gama-glutamyl transpeptidáza).

▼M4

Tabuľka 1

Štandardné parametre klinickej patológie

Hematológia	
Počet erytrocytov	Celkový počet leukocytov
Hematokrit	Diferenciálny počet leukocytov
Koncentrácia hemoglobínu	Počet trombocytov
Stredný korpuskulárny hemoglobín	Potenciál zrážania krvi (vyberte jednu z možností):
Stredný korpuskulárny objem	— Protrombínový čas
Koncentrácia stredného korpuskulárneho hemoglobínu	— Čas zrážania krvi
Retikulocyty	— Čiastočný tromboplastínový čas

Klinická chémia	
Glukóza (*)	Alanín-amintransferáza
Celkový cholesterol	Aspartát-aminotransferáza
Triglyceridy	Alkalická fosfatáza
Dusík z močoviny v krvi	Draslík
Celkový bilirubín	Sodík
Kreatinín	Vápnik
Celkový obsah bielkovín	Fosfor
Albumíny	Chloridy
Globulíny	

Rozbor moču (nepovinné)	
Vzhľad (farba a zakalenie)	Celkový obsah bielkovín
Objem	Glukóza
Špecifická hmotnosť alebo osmolalita	Krv/krvinky
pH	

(*) Keďže dlhé obdobie bez kŕmenia môže pri pokusných zvieratách v porovnaní s kontrolnými zvieratami viesť k skresleniu meraní glukózy, vedúci štúdie by mal určiť, či je primerané, aby sa zvieratá nekŕmili. Ak sa použije obdobie bez kŕmenia, malo by byť primerané použitému živočíšnemu druhu; pri potkanoch to môže byť 16 hodín (nočný pôst). Stanovenie glukózy nalačno sa môže vykonať po nočnom pôste počas posledného týždňa expozície alebo po nočnom pôste pred pitvou (v druhom prípade spolu so všetkými ostatnými parametrami klinickej patológie).

38. Ak existuje dôkaz, že hlavným miestom usadzovania a zachytávania sú dolné dýchacie cesty (t. j. alveoly), ako metóda kvantitatívnej analýzy hypotetických parametrov účinnosti dávky zameranej na hypersenzitívnu pneumonitídu, zápal pľúc a fosfolipidózu sa môže zvoliť bronchoalveolárna laváž (BAL). Tá umožňuje primerane preskúmať priebežné zmeny alveolárneho poškodenia súvisiace so závislosťou reakcie od dávky. Z tekutiny bronchoalveolárnej laváže sa môže analyzovať celkový a diferenciálny počet leukocytov, celkový obsah bielkovín a laktát-dehydrogenáza. Ďalej sa môžu zvážiť parametre indikujúce lyzozomálne poškodenie, fosfolipidózu, fibrózu a dráždivé alebo alergické zápaly, ktoré môžu zahŕňať stanovenie zápalových cytokínov/chemokínov. Merania BAL vo všeobecnosti dopĺňajú výsledky histopatologických testov, nemôžu ich však nahradiť. Usmernenia o postupe pľúcnej laváže sú uvedené v dokumente GD 39 (2).

▼M4

MAKROSKOPICKÁ PATOLÓGIA A ORGÁNOVÉ HMOTNOSTI

39. Všetky testované zvieratá vrátane tých, ktoré uhynú počas testu alebo sa vylúčia zo štúdie z dôvodu starostlivosti o zvieratá, sa podrobujú úplnému vykrveniu (ak je uskutočniteľné) a makroskopickej autopsii. Pri každom zvierati sa zaznamená čas medzi skončením poslednej expozície a utratením. Ak nie je možné vykonať autopsiu ihneď po objavení uhynutého zvieraťa, zviera sa schladí (nie zmrazí) na dostatočne nízku teplotu, aby sa minimalizovala autolýza. Autopsie by sa mali vykonať čo najskôr, zvyčajne v priebehu jedného alebo dvoch dní. Pri každom zvierati sa zaznamenajú všetky makroskopické patologické zmeny, pričom osobitná pozornosť sa venuje akýmkoľvek zmenách v dýchacej sústave.

40. V tabuľke 2 sa uvádza zoznam orgánov a tkanív, ktoré je počas makroskopickej pitvy potrebné zachovať vo vhodnom médiu na účely histopatologického vyšetrenia. O uchovaní orgánov a tkanív [v zátvorke] a všetkých ostatných orgánov a tkanív rozhodne vedúci štúdie. Orgány vyznačené **tučným** písmom by sa mali čo najskôr po disekcii upraviť a odvážiť v mokrom stave, aby sa zabránilo ich vyschnutiu. Štítna žľaza a nadsemenníky by sa mali vážiť iba v prípade potreby, lebo úprava artefaktov môže brániť histopatologickému hodnoteniu. Tkanivá a všetky orgány sa fixujú v 10 % formalínovom tlmivom roztoku alebo v inom vhodnom fixačnom prostriedku ihneď po vykonaní autopsie a nie skôr ako 24 – 48 hodín pred úpravou v závislosti od použitého fixačného prostriedku.

Tabuľka 2

Orgány a tkanivá zachované počas makroskopickej pitvy

Nadobličky	Semenné mechúriky
Kostná dreň (a/alebo čerstvý aspirát)	Miecha (krčná, hrudná a lumbálna)
Mozog (vrátane častí predného mozgu, mozočka a predĺženej miechy/mosta)	**Slezina**
[Oči (sietnica, očný nerv) a očné viečka]	Žalúdok
Srdce	**Semenníky**
Obličky	**Týmus**
Hrtan (tri úrovne, jedna úroveň má zahŕňať základňu epiglotis)	Štítna žľaza
Pečeň	Priedušnica (aspoň dve úrovne vrátane jedného pozdĺžneho rezu cez karinu a jedného priečneho rezu)
Pľúca (všetky laloky na jednej úrovni vrátane hlavných priedušiek)	[Močový mechúr]
Lymfatické uzliny z hilovej oblasti pľúc najmä v prípade tuhých testovaných chemikálií so slabou rozpustnosťou. Pri detailnejších testoch a/alebo štúdiách s imunologickým zameraním sa môžu zvážiť ďalšie lymfatické uzliny, napr. z mediastinálnych, cervikálnych/submandibulárnych a/alebo aurikulárnych oblastí.	Maternica
	Všetky makroskopické poškodenia
Nosohltanové tkanivá [aspoň štyri úrovne; jedna úroveň zahŕňa nosohltanovú trubicu a nosové lymfoidné tkanivo (NALT)]	
Pažerák	
[Čuchový bulbus]	
Vaječníky	

▼M4

41. Pľúca by sa mali odňať neporušené, odvážiť a napustiť vhodným fixačným prostriedkom pri tlaku 20 – 30 cm vody, aby sa zachovala ich štruktúra (5). Je potrebné odobrať rezy všetkých lalokov na jednej úrovni vrátane hlavných priedušiek, ale ak sa robí pľúcna laváž, mali by sa vykonať rezy nelavážovaného laloku na troch úrovniach (nie sériové rezy).

42. Preskúmajú sa najmenej štyri úrovne nosohltanových tkanív, z ktorých jedna by mala obsahovať nosohltanovú trubicu (5, 6, 7, 8, 9), aby sa umožnilo vhodné preskúmanie dlaždicového, prechodného (neriasinkového dýchacieho), dýchacieho (riasinkového dýchacieho) a čuchového epitelu a odvodného lymfatického tkaniva (NALT; 10, 11). Preskúmajú sa tri úrovne hrtana, pričom jedna z týchto úrovní by mala obsahovať základňu epiglotis (12). Je potrebné preskúmať aspoň dve úrovne priedušnice vrátane jedného pozdĺžneho rezu cez karinu bifurkácie extrapulmonárnych priedušiek a jedného priečneho rezu.

HISTOPATOLÓGIA

43. Pri kontrolných skupinách a skupinách s vysokými koncentráciami a pri všetkých zvieratách, ktoré uhynú alebo sú utratené počas štúdie, sa vykoná histopatológia všetkých orgánov a tkanív vymenovaných v tabuľke 2. Osobitná pozornosť by sa mala venovať dýchacím cestám, cieľovým orgánom a makroskopickým poškodeniam. Orgány a tkanivá, ktoré majú poškodenia v skupine s vysokými koncentráciami, sa preskúmajú pri všetkých skupinách. Vedúci štúdie sa môže rozhodnúť pre vykonanie histopatologických hodnotení pri ďalších skupinách s cieľom preukázať jednoznačnú reakciu na koncentráciu. Ak boli použité satelitné skupiny (reverzibilita), histopatologické hodnotenie sa vykoná v prípade všetkých tkanív a orgánov, pri ktorých boli v testovaných skupinách zistené účinky. Ak v skupine s vysokou expozíciou došlo k nadmernému predčasnému úhynu alebo iným problémom, ktoré spochybňujú významnosť údajov, je potrebné histopatologicky preskúmať najbližšiu nižšiu koncentráciu. Sledovanie nálezov pitvy by malo korelovať s mikroskopickými nálezmi.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

44. Je potrebné uviesť údaje o telesnej hmotnosti, spotrebe potravy, klinickej patológii, makroskopickej patológii, orgánových hmotnostiach a histopatológii jednotlivých zvierat. Údaje z klinických pozorovaní sa zhrnú v podobe tabuliek, kde sa uvedie pre každú pokusnú skupinu počet použitých zvierat, počet zvierat vykazujúcich špecifické príznaky toxicity, počet zvierat, ktoré sa našli uhynuté počas testu alebo ich usmrtili z humánnych dôvodov, čas uhynutia jednotlivých zvierat, opis a časový priebeh toxických účinkov a reverzibility a pitevné nálezy. Všetky výsledky, kvantitatívne aj náhodné, sa vyhodnotia primeranou štatistickou metódou. Možno použiť akúkoľvek všeobecne akceptovanú štatistickú metódu, pričom štatistické metódy je potrebné vybrať počas plánovania štúdie.

Správa o teste

45. Správa o teste by mala podľa potreby obsahovať tieto informácie:

Testované zvieratá a chov:

— opis podmienok v klietke vrátane: počtu (alebo zmeny počtu) zvierat na klietku, výstelky, teploty prostredia a relatívnej vlhkosti, dĺžky svetlej fázy a identifikácie krmiva,

▼M4

— použité druhy/kmene a odôvodnenie použitia druhov iných ako potkany, môže sa uviesť zdroj a historické údaje, ak sa týkajú zvierat v podobných podmienkach expozície, umiestnenia a nekŕmenia,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— metóda randomizácie,

— opis akýchkoľvek podmienok pred testovaním vrátane krmiva, karantény a liečby chorôb.

Testovaná chemikália:

— fyzikálny charakter, čistota a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti (vrátane izomerizácie),

— identifikačné údaje a registračné číslo CAS (Chemical Abstract Services), ak je známe.

Nosič:

— odôvodnenie použitia nosiča a odôvodnenie výberu nosiča (ak je iný ako voda),

— historické alebo paralelne získané údaje preukazujúce, že nosič nemá vplyv na výsledky štúdie.

Inhalačná komora:

— podrobný opis inhalačnej komory vrátane objemu a nákresu,

— zdroj a opis zariadenia použitého na expozíciu zvierat, ako aj na vytvorenie ovzdušia,

— zariadenie na meranie teploty, vlhkosti, veľkosti častíc a skutočnej koncentrácie,

— zdroj vzduchu a použitý klimatizačný systém,

— metódy použité na kalibráciu zariadenia s cieľom zabezpečiť homogénne testovacie ovzdušie,

— rozdiel tlakov (pozitívny alebo negatívny),

— expozičné otvory na jednu komoru (v prípade expozície oblasti nosa), umiestnenie zvierat v komore (v prípade expozície celého tela),

— stabilita testovacieho ovzdušia,

— umiestnenie senzorov teploty a vlhkosti a odber vzorky testovacieho ovzdušia v komore,

— manipulácia s privádzaným/extrahovaným vzduchom,

— hodnoty prietoku vzduchu, prietok vzduchu na jeden expozičný otvor (v prípade expozície oblasti nosa) alebo množstvo zvierat na komoru (v prípade expozície celého tela),

— čas potrebný na dosiahnutie rovnováhy v inhalačnej komore (t95),

— počet zmien objemu za hodinu,

— meracie prístroje (ak sa použili),

Údaje o expozícii:

— odôvodnenie výberu cieľovej koncentrácie pre základnú štúdiu,

▼M4

— nominálne koncentrácie (celková hmotnosť testovanej chemikálie aplikovanej do inhalačnej komory vydelená objemom vzduchu, ktorý prešiel komorou),

— skutočné koncentrácie testovanej chemikálie zachytenej z dýchacej zóny zvierat, v prípade zmesí, ktoré vytvárajú heterogénne fyzikálne skupenstvá (plyny, pary, aerosóly) možno každé skupenstvo analyzovať samostatne,

— všetky koncentrácie vzduchu sa udávajú v hmotnostných jednotkách (mg/l mg/m^3 atď.), nie v objemových jednotkách (ppm, ppb atď.),

— rozdelenie veľkosti častíc, stredný aerodynamický hmotnostný priemer (MMAD) a štandardná odchýlka geometrického priemeru (σ_g) vrátane metód ich výpočtu. Jednotlivé analýzy veľkosti častíc sa uvedú v správe.

Podmienky testovania:

— podrobné informácie o príprave testovanej chemikálie vrátane podrobných údajov o všetkých postupoch použitých na zmenšenie veľkosti častíc tuhých látok alebo na prípravu roztokov testovanej chemikálie,

— opis (podľa možnosti spolu s nákresom) zariadenia použitého na vytvorenie testovacieho ovzdušia a na expozíciu zvierat testovaciemu ovzdušiu,

— podrobné informácie o zariadeniach použitých na monitorovanie teploty, vlhkosti a prúdenia vzduchu v komore (napr. vývoj kalibračnej krivky),

— podrobné informácie o zariadeniach použitých pri odbere vzoriek na stanovenie koncentrácie v komore a rozdelenia veľkosti častíc,

— podrobné informácie o použitej chemickej analytickej metóde a o overení metódy (vrátane účinnosti výťažnosti testovanej chemikálie z prostriedku na odber vzorky),

— metóda randomizácie pri prideľovaní zvierat do testovacích a kontrolných skupín,

— údaje o kvalite krmiva a vody (vrátane druhu/zdroja krmiva, zdroja vody),

— odôvodnenie výberu testovacích koncentrácií.

Výsledky:

— tabuľkové spracovanie teploty, vlhkosti a prúdenia vzduchu v komore,

— tabuľkové spracovanie údajov o nominálnych a skutočných koncentráciách,

— tabuľkové spracovanie údajov o veľkosti častíc vrátane údajov o odbere vzoriek na analýzu, o rozdelení veľkosti častíc a o výpočtoch MMAD a σ_g,

— tabuľkové spracovanie získaných údajov o reakcii a úrovni koncentrácie pre každé zviera (t. j. zvieratá vykazujúce príznaky toxicity vrátane mortality, charakteru, závažnosti, času nástupu a trvania účinkov),

▼M4

— tabuľkové spracovanie hmotností jednotlivých zvierat,

— tabuľkové spracovanie spotreby potravy,

— tabuľkové spracovanie údajov klinickej patológie,

— pitevné nálezy a histopatologické nálezy pre každé zviera, ak sú k dispozícii,

— tabuľkové spracovanie akýchkoľvek ďalších meraných parametrov.

Rozbor a interpretácia výsledkov:

— osobitný dôraz sa kladie na opis metód použitých na splnenie kritérií tejto testovacej metódy, napr. limitnej koncentrácie alebo veľkosti častíc,

— dýchateľnosť častíc vzhľadom na celkové zistenia sa uvedie, najmä ak nebolo možné splniť kritériá na veľkosť častíc,

— konzistencia metód použitých na stanovenie nominálnej a skutočnej koncentrácie a vzťah skutočnej koncentrácie k nominálnej koncentrácii sa uvedú v celkovom hodnotení štúdie,

— uvedie sa pravdepodobná príčina uhynutia a prevládajúci druh pôsobenia (systémové verzus lokálne),

— uvedie sa odôvodnenie, ak bolo potrebné humánnym spôsobom utratiť zvieratá, ktoré mali bolesti alebo vykazovali príznaky silného alebo pretrvávajúceho utrpenia, v súlade s kritériami v usmerňovacom dokumente OECD o humánnych parametroch (Guidance Document on Humane Endpoints) (3),

— identifikuje sa cieľový orgán (orgány),

— stanoví sa NOAEL a LOAEL.

LITERATÚRA

1. OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Paríž.

2. OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paríž.

3. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paríž.

4. Whalan, J. E., a Redden, J. C. (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

5. Dungworth, D. L., Tyler, W. S., Plopper, C. E. (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H. P. a Brain, J. D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, s. 229 – 258.

6. Young, J. T. (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309 – 312.

7. Harkema, J. R. (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231 – 238.

▼**M4**

8. Woutersen, R. A., Garderen-Hoetmer, A., van Slootweg, P. J., Feron, V. J. (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP a Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, s. 215 – 263.

9. Mery, S., Gross, E. A., Joyner, D. R., Godo, M., Morgan, K. T. (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353 – 372.

10. Kuper, C. F., Koornstra, P. J., Hameleers, D. M. H., Biewenga, J., Spit, B. J., Duijvestijn, A. M., Breda Vriesman van, P. J. C., Sminia, T. (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219 – 224.

11. Kuper, C. F., Arts, J. H. E., Feron, V. J. (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140 – 141: s. 281 – 285.

12. Lewis, D. J. (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419 – 428.

13. Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006 (Ú. v. EÚ L 353, 31.12.2008, s. 1).

▼**M4**

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMU

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

▼B

B.9. **TOXICITA PO 28–DŇOVEJ OPAKOVANEJ DÁVKE (DERMÁLNA)**

1. **METÓDA**

1.1. ÚVOD

Pozri všeobecný úvod časť B (A).

1.2. POJMY

Pozri všeobecný úvod časť B (B).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Testovaná látka sa nanáša na kožu denne v odstupňovaných dávkach viacerým skupinám pokusných zvierat, a to jedna dávka na jednu skupinu počas 28 dní. Počas trvania testu sa zvieratá denne pozorujú, aby sa zistili symptómy toxických účinkov. Zvieratá, ktoré uhynú počas testu, ako aj zvieratá, ktoré prežijú do konca testu, sa pitvú.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS SKÚŠOBNE J METÓDY

1.6.1. **Príprava**

Zvieratá si pred začatím testu zvykajú minimálne 5 dní na experimentálne chovateľské a kŕmne podmienky. Pred testom sa zdravé mladé zvieratá randomizujú a priraďujú k jednotlivým exponovaným a kontrolným skupinám. Krátko pred začatím testu sa strihá srsť na chrbte pokusných zvierat. Oholenie srsti je tiež možné, ale dalo by sa vykonať 24 hodín pred začatím testu. Opakované strihanie a holenie je zvyčajne potrebné približne v týždňových intervaloch. Je potrebné dbať na to, aby sa nepoškodila koža. Na aplikáciu sa musí pripraviť minimálne 10 % povrchu kože. Pri určovaní oblasti určenej na ostrihanie aplikačnej plochy sa zohľadňuje hmotnosť zvierat. Ak sa používajú tuhé látky, ktoré sa môžu jemne rozomlieť na prášok, mala by byť testovaná látka dostatočne navlhčená vodou alebo tam, kde je to potrebné, vhodným vehikulom, aby sa zabezpečil dobrý kontakt s kožou. Tekuté testované látky sa vo všeobecnosti používajú nezriedené. Aplikácia sa vykonáva denne 5 až 7 dní za týždeň.

1.6.2. **Podmienky skúšania**

1.6.2.1. *Pokusné zvieratá*

Môže sa použiť dospelý potkan, králik alebo morča. Môžu sa použiť aj iné druhy, ich použitie sa však musí zdôvodniť.

▼B

Odchýlka telesnej hmotnosti zvierat daného testu by nemala byť na začiatku testu viac ako ± 20 % od príslušnej strednej priemernej hodnoty.

1.6.2.2. *Počet a pohlavie*

Pre každú veľkosť dávky sa používa minimálne 10 zvierat (5 samčekov a 5 samičiek) so zdravou, nepoškodenou kožou. Samičky musia byť nezapustené a nesmú byť gravidné. Ak sa majú počas testu humánne usmrtiť zvieratá, tak sa musí celkový počet zvierat zvýšiť o počet zvierat, ktoré majú byť humánne usmrtené, ešte pred koncom testu. Okrem toho sa môže exponovať satelitná skupina s 10 zvieratami (5 zvierat na pohlavie) počas 28 dní s najvyššou dávkou a počas nasledujúcich 14 dní bez ošetrenia sa dbá na reverzibilitu, pretrvávanie alebo oneskorený prejav toxických účinkov. Používa sa tiež satelitná skupina s 10 kontrolnými zvieratami (5 zvierat na pohlavie).

1.6.2.3. *Veľkosti dávok*

Musia sa zvoliť minimálne tri dávky, ako aj jedna kontrolná skupina, alebo ak sa použije pomocná látka, kontrolná skupina s pomocnou látkou. Čas pôsobenia by mal trvať minimálne 6 hodín denne. Aplikácia testovanej látky by sa mala vykonávať v ten istý čas každý deň a prispôsobenie dávky telesnej hmotnosti sa vykonáva v stanovených intervaloch (raz týždenne alebo dvakrát týždenne), aby sa zachovala konštantná hladina dávky v relácii k telesnej hmotnosti. Odhliadnuc od aplikácie testovanej látky, zvieratá kontrolnej skupiny sa ošetrujú rovnakým spôsobom ako pokusné zvieratá. Ak sa na uľahčenie aplikácie použije vehikulum, tak sa kontrolnej skupine podáva vehikulum rovnakým spôsobom ako exponovaným zvieratám, a to v množstve, aké dostane skupina s najvyššou dávkou. Najvyššia dávka sa volí tak, aby sa v každom prípade prejavili toxické efekty, ale aby zvieratá neuhynuli alebo iba v malom množstve. Najnižšia dávka by nemala vyvolávať žiadne príznaky toxicity. Ak existujú použiteľné odhady o výške expozície u človeka, tak by mala najnižšia dávka túto hodnotu prekračovať. Podľa možnosti by mala stredná dávka spôsobovať len malé toxické účinky. Ak sa podávajú viaceré medzidávky, tak sa majú voliť tak, aby došlo k postupnej klasifikácii toxických účinkov. V skupinách s nízkou alebo strednou dávkou, ako aj v kontrolných skupinách by mal byť počet úmrtí nízky, aby sa zabezpečilo kvalitné vyhodnotenie výsledkov.

Ak aplikácia testovanej látky vedie k silným podráždeniam kože, mala by sa koncentrácia znížiť, čo môže pri vysokej dávke viesť k zníženiu alebo vynechaniu ostatných toxických účinkov. Ak sa okrem toho koža veľmi poškodila, je za určitých okolností potrebné prerušiť test a nanovo ho realizovať s nižšími koncentráciami.

1.6.2.4. *Limitný test*

Ak pri realizácii predčasnej štúdie podanie dávky 1 000 mg/kg alebo vyššej dávky, ktorá zodpovedá možnej expozícii u človeka, nespôsobí žiadne toxické účinky, nie je potrebný ďalší test.

1.6.2.5. *Čas pozorovania*

Pri všetkých zvieratách sa denne pozorujú symptómy toxických účinkov. Smrť a čas vzniku a zániku symptómov sa musia zaznamenať.

▼B

1.6.3. **Postup**

Zvieratá sa musia udržiavať jednotlivo v klietkach. Testovanú látku dostávajú sedem dní do týždňa počas 28 dní. Zvieratá satelitnej skupiny, ktoré sú určené na dodatočné pozorovanie, by mali byť ďalších 14 dní bez ošetrenia, aby sa pozorovala reverzibilita alebo pretrvávanie toxických účinkov. Expozičná doba je minimálne šesť hodín denne.

Testovaná látka sa nanáša jednotne na oblasť, ktorá zodpovedá asi 10 % povrchu tela. Pri veľmi toxických látkach sa môže ošetrovať plocha menšia, ale väčšia plocha by mala byť exponovaná čo možno s najtenšou a najrovnomernejšou vrstvou.

Testovaná látka sa počas expozičnej doby udržiava v kontakte s kožou pomocou gázového obväzu a jednej náplasti. Pokusná plocha sa musí okrem toho zakryť vhodným spôsobom, aby sa gázový obväz a testovaná látka prichytili a zaistili a aby zvieratá nemohli orálne prijať testovanú látku. Môžu sa použiť aj prostriedky na obmedzenie slobody pohybu, avšak úplná imobilizácia sa neodporúča. Ako alternatíva sa môže použiť „manžeta na krk“.

Po uplynutí expozičnej doby sa odstráni, pokiaľ je to možné, zvyšok testovanej látky, a to použitím vody alebo iným vhodným postupom na čistenie kože.

Všetky zvieratá sa musia denne sledovať a zapisovať príznaky toxických účinkov vrátane času vzniku, ako aj stupňa a trvania. Sledovania sa majú zameriavať hlavne na zmeny na koži, srsti, očiach a slizniciach, dýchaní, krvnom obehu, autonómnom a centrálnom nervovom systéme, ako aj na somatomotorike a na správaní. Príjem potravy a hmotnosť zvierat sa určujú každý týždeň. Pravidelné pozorovanie zvierat je potrebné, aby sa dalo čo najlepšie zabezpečiť, aby zvieratá neuhynuli počas testu na kanibalizmus, autolýzu tkanív alebo chybu pri premiestňovaní. Po ukončení testu sa všetky zvieratá, ktoré prežili, s výnimkou satelitnej skupiny, pitvú. Hynúce zvieratá, ako aj zvieratá, u ktorých sa zistili silné príznaky utrpenia alebo bolesti, sa musia okamžite oddeliť, humánne usmrtiť a pitvať metódou prijateľnou pre zvieratá.

Na konci testu sa musia všetky zvieratá, vrátane kontrolných zvierat, podrobiť nasledujúcim vyšetreniam:

1. hematologickému vyšetreniu, ktoré by malo zahŕňať aspoň určovanie hodnoty hematokrytu a koncentrácie hemoglobínu, počet erytrocytov, celkový a diferenciálny počet leukocytov, ako aj hemokoagulačné parametre;

2. klinickobiochemickej analýze krvi: na posúdenie funkcie pečene a obličiek by sa mal určiť minimálne jeden z týchto parametrov: alanín-amino-tranferáza (skôr známa ako sérum-glutamát-pyruvat-transamináza), asparta-aminotranferáza (skôr známa ako sérum-glutamát-oxalacetát-transamináza), močovinový dusík, albumín, kreatinín, celkový bilirubín a celkové bielkoviny v sére.

Ďalšie stanovenia, ktoré môžu byť potrebné na adekvátne toxikologické vyhodnotenie, zahŕňajú: vápnik, fosfor, chlorid, sodík, draslík, glukózu nalačno, lipidy, hormóny, rovnováhu medzi kyselinami a zásadami, methemoglobín a aktiviu cholínesterázy.

▼B

Tam, kde je to potrebné, sa môžu využiť dodatočné klinickobiochemické analýzy na rozšírenie skúmania pozorovaných účinkov.

1.6.4. **Pitva**

Na všetkých zvieratách, ktoré sa zúčastnili na teste, sa vykoná kompletná autopsia. Aspoň pečeň, obličky, nadobličky a semenníky sa čo najskôr po sekcii odvážia vlhké, aby sa zabránilo ich vysychaniu. Orgány a tkanivá, t. j. neexponovaná a exponovaná koža, pečeň, obličky, slezina, semenníky, nadobličky, srdce a cieľové orgány (orgány s makroskopickými zmenami alebo zmenami veľkosti), sa uchovávajú vo vhodnom médiu na možné neskoršie histopatologické vyšetrenie.

1.6.5. **Histopatologické vyšetrenia**

U všetkých zvierat skupiny s najvyššou dávkou, ako aj u zvierat kontrolnej skupiny sa musí vykonať histologické vyšetrenia konzervovaných orgánov a tkanív. Všetky orgány a tkanivá, ktoré vykazujú v skupinách s najvyššou dávkou poškodenia podmienené testovanou látkou, sa musia vyšetriť aj v ostatných skupinách s nižšou dávkou. U zvierat satelitnej skupiny sa musia veľmi dôkladne vyšetriť tie orgány a tkanivá, v ktorých sa u ostatných exponovaných skupín prejavili príznaky otravy.

2. **ÚDAJE**

Údaje sa zhrnú do tabuľky, z ktorej musí byť jasný počet zvierat pre každú testovanú skupinu a kontrolnú skupinu na začiatku testu a počet zvierat s jednotlivými formami poškodenia.

Všetky zistené výsledky sa vyhodnocujú vhodnou štatistickou metódou. Môže sa použiť akákoľvek uznávaná štatistická metóda.

3. **SPRÁVA**

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

— údaje o zvieratách (druh, kmeň, pôvod, chovateľské podmienky, krmivo atď.),

— podmienky skúšania (vrátane druhu obväzu: okluzívny alebo neokluzívny),

— veľkosti dávky (vrátane vehikula, ak sa použilo) a koncentráciu,

— tam, kde je to možné, „no effect-level“,

— údaje o toxických reakciách podľa pohlavia a koncentrácie,

— čas smrti počas testu alebo údaj, či zvieratá test prežili do konca testu,

— toxické a iné účinky,

— čas pozorovania jednotlivých príznakov toxických účinkov, ich ďalší priebeh,

— údaje o kŕmení a telesnú hmotnosť,

— hematologické testy a ich výsledky,

▼B

— klinickobiochemické testy a ich výsledky,

— pitevné nálezy,

— podrobný opis histopatologických nálezov,

— štatistické vyhodnotenie výsledkov,

— diskusiu o výsledkoch,

— interpretáciu výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B (D).

4. **ODKAZY**

Pozri všeobecný úvod časť B (E).

▼B

B.10. **MUTAGÉNNOSŤ – *IN VITRO* TEST CHROMOZÓMOVEJ ODCHÝLKY U CICAVCOV**

1. **METÓDA**

Táto metóda je duplikátom *in vitro* testu chromozómovej odchýlky u cicavcov (1997), označenej OECD TG 473.

1.1. ÚVOD

Účelom *in vitro* testu chromozómovej odchýlky u cicavcov je identifikovať činidlá, ktoré spôsobujú štrukturálne chromozómové odchýlky v pestovaných bunkách cicavcov (1) (2) (3). Štrukturálne odchýlky môžu byť v dvoch typoch, chromozómové alebo chromatidové. Väčšina chemických mutagénov vyvoláva chromatidové odchýlky, avšak vyskytujú sa tiež chromozómové odchýlky. Nárast polyploidie môže naznačovať, že chemikália má potenciál spôsobiť číselné odchýlky. Táto metóda však nie je určená na meranie číselných odchýlok a bežne sa na tento účel nepoužíva. Chromozómové mutácie a podobné udalosti sú príčinou mnohých ľudských genetických chorôb a existujú dostatočné dôkazy o tom, že chromozómové mutácie a podobné udalosti spôsobujúce odchýlky onkogénov a génov na potláčanie nádorov somatických buniek sú prítomné pri vzniku rakoviny u ľudí a pokusných zvierat.

In vitro test chromozómovej odchýlky u cicavcov môže obsahovať kultúry preukázaných bunkových línií, bunkové kmene alebo kultúry primárnych buniek. Použité bunky sa vyberajú na základe rastovej schopnosti kultúry, stability karyotypu, chromozómového čísla, chromozómovej diverzity a spontánnej frekvencie chromozómových odchýlok.

Testy vykonávané *in vitro* vo všeobecnosti vyžadujú použitie exogénneho zdroja metabolickej aktivácie. Tento systém metabolickej aktivácie nemôže úplne napodobniť podmienky cicavcov *in vivo*. Je potrebné sa starostlivo vyhnúť podmienkam, ktoré by viedli k pozitívnym výsledkom, ktoré neodrážajú vnútornú mutagénnosť a ktoré môžu pochádzať zo zmien pH, osmolality alebo vysokých hladín cytotoxicity (4) (5).

Tento test sa používa na zistenie možných mutagénov a karcinogénov u cicavcov. Mnohé zlúčeniny, ktoré sú v tomto teste pozitívne, sú pre cicavcov karcinogénmi, avšak medzi týmto testom a karcinogénnosťou neexistuje dokonalá korelácia. Korelácia závisí od triedy chemikálie a je čoraz viac dôkazov, že existujú karcinogény, ktoré tento test neodhalí, pretože pravdepodobne účinkujú prostredníctvom mechanizmov odlišných od priameho poškodenia DNA.

Pozri tiež všeobecný úvod k časti B.

1.2. DEFINÍCIE

Odchýlka chromatidového typu: štrukturálne chromozómové poškodenie prejavujúce sa ako pretrhnutie jednotlivých chromatidov alebo pretrhnutie a opätovné spojenie chromatidov.

Odchýlka chromozómového typu: štrukturálne chromozómové poškodenie prejavujúce sa ako pretrhnutie alebo pretrhnutie a opätovné spojenie oboch chromatidov na rovnakom mieste.

▼B

Endoreduplikácia: proces, v ktorom po S perióde replikácie DNA jadro neprechádza do mitózy, ale začína novú S periódu. Výsledkom sú chromozómy so 4, 8, 16... chromatidmi.

Trhlina: achromatická lézia, menšia ako šírka jedného chromatidu s minimálnym posunutím chromatidov.

Mitotický index: pomer buniek v metafáze delený celkovým počtom buniek pozorovaných v populácii buniek; náznak stupňa šírenia tejto populácie.

Číselná (numerická) odchýlka: zmena v počte chromozómov v porovnaní s normálnou číselnou (numerickou) charakteristikou použitých buniek.

Polyploidia: násobok haploidného počtu chromozómov (*n*) odlišný od počtu diploidov (t. j. 3n, 4n atď.)

Štrukturálna odchýlka: zmena v chromozómovej štruktúre rozpoznateľná mikroskopickým skúmaním metafázového štádia delenia buniek, pozorovaná ako vynechania a fragmenty, vnútorné zmeny alebo zámeny.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Bunkové kultúry sú exponované testovacou látkou s metabolickou aktiváciou aj bez nej. Vo vopred určených intervaloch po expozícii bunkových kultúr testovacou látkou sa spracúvajú látkou zastavujúcou metafázu (napr Colcemidom® alebo colchicínom), zozbierajú sa, zafarbia sa a metafázové bunky sa mikroskopicky analyzujú na zistenie prítomnosti chromozómových odchýlok.

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Prípravné práce**

1.4.1.1. *Bunky*

Môžu sa použiť rôzne bunkové línie, kmene alebo primárne bunkové kultúry vrátane ľudských buniek (napríklad: fibroblasty čínskych morčiat, periférne krvné lymfocyty ľudí alebo iných cicavcov).

1.4.1.2. *Médiá a podmienky kultúr*

Pri udržiavaní kultúr sa používajú príslušné médiá a inkubačné podmienky (kultivačné nádoby, koncentrácia CO_2, teplota a vlhkosť). Získané bunkové línie a kmene sa pravidelne kontrolujú na stabilitu modálneho chromozómového čísla a absenciu mykoplazmatickej kontaminácie a v prípade kontaminácie sa nepoužívajú. Mal by byť známy čas normálneho bunkového cyklu a podmienky použitých kultúr.

1.4.1.3. *Príprava kultúr*

Zistené bunkové línie a kmene: bunky sa odoberajú z uskladnených kultúr, zasievajú sa do média kultúry v takej hustote, pri ktorej kultúry nedosiahnu zhluk pred časom zberu, a inkubujú sa pri teplote 37 °C.

▼B

Lymfocyty: celá krv ošetrená antikoagulantom (napríklad: heparínom) alebo separované lymfocyty získané od zdravých subjektov sa pridávajú do média kultúry obsahujúceho mitogén (napríklad: fytohemaglutinín) a inkubované sa pri teplote 37 °C.

1.4.1.4. *Metabolická aktivácia*

Bunky sú exponované testovacou látkou za prítomnosti i za neprítomnosti príslušného systému metabolickej aktivácie. Najpoužívanejším systémom je postmitochondriálna frakcia podporená kofaktorom (S 9), pripravená z pečene hlodavcov ošetrených prípravkami na indukciu enzýmov, ako napríklad Aroclorom 1254 (6) (7) (8) (9) alebo zmesou fenobarbitonu a beta-naftoflavónu (10) (11) (12).

Postmitochondriálna frakcia sa zvyčajne používa v koncentráciách v rozpätí od 1 % – 10 % v/v v konečnom testovacom médiu. Stav systému metabolickej aktivácie môže závisieť od triedy testovanej chemikálie. V niektorých prípadoch môže byť vhodné využiť viac než jednu koncentráciu postmitochondriálnej frakcie.

Pre endogénnu aktiváciu môže poskytnúť potenciál množstvo situácií vrátane vytvorenia geneticky vypestovaných bunkových línií vyjadrujúcich špecifické aktivačné enzýmy. Výber použitých bunkových línií by mal byť vedecky podložený (napríklad: relevantnosťou cytochrómového P450 izoenzýmu pre metabolizmus testovacej látky).

1.4.1.5. *Testovacia látka/príprava*

Pevné testovacie látky sa rozpúšťajú alebo ukladajú v príslušných rozpúšťadlách alebo nosičoch a rozrieďujú, ak je to vhodné, pred ošetrením buniek. Kvapalné testovacie látky môžu byť pridané priamo do testovacích systémov a/alebo rozriedené pred ošetrením. Používajú sa čerstvé prípravky testovacej látky, pokiaľ údaje o stabilite nepoukazujú na prijateľnosť uskladnenia.

1.4.2. **Podmienky testov**

1.4.2.1. *Rozpúšťadlo/nosič*

Rozpúšťadlo/nosič by nemali chemicky reagovať s testovacou látkou a mali by byť kompatibilné s prežitím buniek a aktivitou S9. Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by malo byť podporené údajmi označujúcimi ich kompatibilitu. Odporúča sa, aby sa kedykoľvek, keď je to možné, zvážilo použitie vodného rozpúšťadla/nosiča. Pri testovaní vo vode nestabilných látok by organické rozpúšťadlá nemali obsahovať vodu. Vodu možno odstrániť pridaním molekulárneho sitka.

1.4.2.2. *Koncentrácie pri expozícii*

Medzi kritériá, ktoré treba zvážiť pri určovaní najvyššej koncentrácie, patrí cytotoxicita, rozpustnosť v testovacom systéme a zmeny pH alebo osmolality.

Cytotoxicita sa stanovuje s metabolickou aktiváciou a bez metabolickej aktivácie pri hlavnom pokuse použitím príslušného označenia integrity a rastu buniek, ako napríklad stupňa zhlukovania, počtu životaschopných buniek alebo mitotického indexu. Užitočné môže byť stanoviť cytotoxicitu a rozpustnosť v predbežnom pokuse.

▼B

Používajú sa najmenej tri analyzovateľné koncentrácie. Pri výskyte cytotoxicity tieto koncentrácie pokrývajú rozsah od maximálnej po malú alebo žiadnu toxicitu; toto zvyčajne znamená, že koncentrácie majú byť oddelené najviac koeficientom medzi 2 a √10. V čase zberu by mala najvyššia koncentrácia ukazovať významný pokles stupňa zhlukovania, počtu buniek alebo mitotického indexu (všetky viac ako 50 %). Mitotický index je iba nepriamym meradlom cytotoxických/cytostatických účinkov a závisí od času po ošetrení. Mitotický index je však akceptovateľný pre suspenzné kultúry, v ktorých iné merania toxicity môžu byť náročné a nepraktické. Informácie o kinetike bunkových cyklov, ako napríklad priemerný generačný čas (average generation time – AGT), sa môžu použiť ako doplnkové informácie. AGT je však celkovým priemerom, ktorý nie vždy odhaľuje existenciu oneskorených subpopulácií, a aj malé zvýšenie priemerného generačného času môže byť spojené s veľmi podstatným oneskorením času optimálneho výťažku odchýlok.

Pre relatívne necytotoxické látky sú maximálne testovacie koncentrácie 5 µl/ml (5 mg/ml) alebo 0,01 M, podľa toho, ktorá je najnižšia.

Pre relatívne nerozpustné látky, ktoré nie sú toxické pri koncentráciách nižších ako nerozpustné koncentrácie, najvyššia použitá dávka je koncentráciou nad limit rozpustnosti v konečnom médiu kultúry na konci ošetrovacieho obdobia. V niektorých prípadoch (napríklad keď sa vyskytne toxicita len na vyššej ako najnižšej nerozpustnej koncentrácii) je vhodné testovať na viac než jednej koncentrácii s viditeľným zrážaním. Užitočné môže byť odhadnúť rozpustnosť na začiatku a na konci podávania, keďže rozpustnosť sa môže zmeniť počas priebehu expozície v testovacom systéme pre prítomnosť buniek, séra S9 atď. Nerozpustnosť sa dá zistiť voľným okom. Zrazenina hodnoteniu neprekáža.

1.4.2.3. *Negatívne a pozitívne kontroly*

Každý pokus má obsahovať pozitívne a negatívne (rozpúšťadlo alebo nosič) kontroly, a to obe s metabolickou aktiváciou a bez metabolickej aktivácie. Pri použití metabolickej aktivácie je pozitívna kontrolná chemikália tá, pri ktorej sa na vznik mutagénnej reakcie vyžaduje aktivácia.

Pozitívne kontroly využívajú známy elastogén s úrovňami vystavenia, pri ktorých sa očakáva reprodukovateľný a zistiteľný nárast na pozadí, ktoré preukazuje citlivosť testovacieho systému.

Koncentrácie pozitívnej kontrolnej látky sa volia tak, aby boli účinky jasné, ale aby pozorovateľovi priamo neodhaľovali identitu kódovaných sklíčok. Príklady pozitívnych kontrolných látok:

Stav metabolickej aktivácie	Látka	Číslo CAS	Číslo EINECS
Neprítomnosf exogénnej metabolickej aktivácie	metylmetánsulfonát	66-27-3	200-625-0
	etylmetánsulfonát	62-50-0	200-536-7

▼B

Stav metabolickej aktivácie	Látka	Číslo CAS	Číslo EINECS
	etylnitrozkarbamid	759-73-9	212-072-2
	mytomicín C	50-07-7	200-008-6
	4-nitrochinolín-N-oxid	56-57-5	200-281-1
Prítomnosf exogénnej metabolickej aktivácie	benzo[a]pyrén	50-32-8	200-028-5
	cyklofosfamid monohydrát cyklofosfamidu	50-18-0 6055-19-2	200-015-4

Možno použiť iné vhodné pozitívne kontrolné látky. Podľa dostupnosti sa tiež zváži použitie príbuzných chemikálií pre pozitívnu kontrolnú skupinu v chemickej triede.

Negatívne kontroly pozostávajúce iba zo samotného rozpúšťadla alebo nosiča v médiu a ošetrené rovnakým spôsobom ako ošetrované kultúry sa zahrnú pre každý čas zberu. Používajú sa tiež neošetrené kontrolné látky, pokiaľ neexistujú historické kontrolné údaje poukazujúce na to, že vybrané rozpúšťadlo nespôsobuje žiadne rušivé ani mutagénne efekty.

1.4.3. **Postup**

1.4.3.1. *Pôsobenie testovacej látky*

Na rozširujúce sa bunky pôsobí testovacia látka za prítomnosti aj za neprítomnosti systému metabolickej aktivácie. Ošetrenie lymfocytov by malo začať približne 48 hodín po mitogénnej stimulácii.

1.4.3.2. Pri každej koncentrácii sa používajú duplicitné kultúry a rozhodne sa odporúčajú pre negatívne/rozpúšťadlové kontrolné kultúry. Ak možno demonštrovať minimálnu variáciu medzi duplicitnými kultúrami (13) (14) z historických údajov, môže byť pre jednotlivé kultúry prijateľné použitie pri každej koncentrácii.

Plynné alebo prchavé látky sa testujú príslušnými metódami, ako napríklad v hermeticky uzavretých nádobách (15) (16).

1.4.3.3. *Čas zberu kultúry*

Pri prvom pokuse sú bunky vystavené testovacej látke, a to s metabolickou aktiváciou aj bez metabolickej aktivácie na 3 – 6 hodín, a vzorky z nich sa odoberajú v čase rovnajúcom sa približne 1,5-násobku dĺžky bežného cyklu buniek po začatí pokusu (12). Ak tento protokol ukáže negatívne výsledky s aktiváciou i bez aktivácie, uskutoční sa ďalší pokus bez aktivácie s neustálym podávaním až po odobratie vzorky v čase rovnajúcom sa približne 1,5-násobku dĺžky bežného cyklu buniek. Niektoré chemikálie sa dajú jednoduchšie zistiť pri časoch dlhších ako 1,5-násobok dĺžky cyklu. Negatívne výsledky s metabolickou aktiváciou sa musia potvrdiť od prípadu k prípadu. V tých prípadoch, keď sa potvrdenie negatívnych výsledkov nepovažuje za potrebné, vypracuje sa zdôvodnenie.

▼B

1.4.3.4. *Príprava chromozómov*

Bunkové kultúry sa ošetrujú Colcemidom® alebo colchicinom zvyčajne 1 – 3 hodiny pred zberom. Každá bunková kultúra sa zbiera a spracúva oddelene na prípravu chromozómov. Príprava chromozómov zahŕňa hypotonické ošetrenie buniek, fixáciu a sfarbenie.

1.4.3.5. *Analýza*

Všetky sklíčka vrátane sklíčok s pozitívnymi a negatívnymi kontrolami sa pred mikroskopickou analýzou nezávisle označia kódmi. Keďže fixačné postupy často ústia do pretrhnutia časti metafázových buniek so stratou chromozómov, vyhodnocované bunky by preto mali obsahovať niekoľko centromér rovnajúcich sa modálnemu číslu ± 2 pre všetky typy buniek. Na jednu koncentráciu a kontrolnú vzorku sa vyhodnocuje najmenej 200 dobre rozšírených metafáz, rovnakým dielom rozdelených medzi duplikátmi. Tento počet možno znížiť, ak sa pozoruje vysoký počet odchýlok.

Hoci účelom tohto testu je zistiť štrukturálne chromozómové odchýlky, je dôležité zaznamenať polyploidiu a endoreduplikáciu, keď sa tieto javy pozorujú.

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Experimentálnou jednotkou je bunka, a preto sa hodnotí percentuálny podiel buniek so štrukturálnou chromozómovou odchýlkou/odchýlkami. Rôzne typy štrukturálnych chromozómových odchýlok sa uvádzajú v zozname s ich číslami a frekvenciami pre pokusné a kontrolné kultúry. Trhliny sa zaznamenávajú oddelene a uvádzajú sa, ale zvyčajne sa nezahŕňajú do celkovej frekvencie odchýlok.

Zaznamenávajú sa tiež súbežné merania cytotoxicity pre všetky ošetrené a negatívne kontrolné kultúry pri hlavných pokusoch.

Uvádzajú sa údaje o jednotlivých kultúrach. Všetky údaje sa tiež sumarizujú v tabuľkovej forme.

Neexistuje požiadavka na overenie jasnej pozitívnej reakcie. Nejasné výsledky sa objasňujú ďalším testovaním, najmä využitím modifikácie pokusných podmienok. Potreba potvrdenia negatívnych výsledkov bola uvedená v bode 1.4.3.3. Modifikácia študijných parametrov na rozšírenie rozsahu hodnotených podmienok sa zváži pri dodatočných pokusoch. Študijné parametre, ktoré sa môžu modifikovať, zahŕňajú koncentráciu a podmienky metabolickej aktivácie.

2.2. HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Pre stanovenie pozitívneho výsledku existuje niekoľko kritérií, ako napríklad nárast spojený s koncentráciou alebo reprodukovateľný nárast počtu buniek s chromozómovými odchýlkami. Najprv sa zvažuje biologická relevantnosť výsledkov. Ako pomôcka sa pri hodnotení výsledkov testov používajú štatistické metódy (3) (13). Štatistický význam nie je pre pozitívnu reakciu jediným určujúcim faktorom.

▼B

Nárast počtu polyploidných buniek môže naznačovať, že testovacia látka má potenciál brzdiť mitotické procesy a indukovať numerické chromozómové odchýlky. Nárast počtu buniek s endoreduplikovanými chromozómami môže naznačovať, že testovacia látka má potenciál brzdiť priebeh bunkového cyklu (17) (18).

Testovacia látka, pre ktorú výsledky nespĺňajú vyššie uvedené kritériá, sa v tomto systéme považuje za nemutagénnu.

Hoci väčšina pokusov poskytne jasne pozitívne alebo negatívne výsledky, v zriedkavých prípadoch súbor údajov vopred vylúči konečný verdikt o aktivite testovacej látky. Výsledky môžu ostať nejasné alebo spochybniteľné bez ohľadu na počet opakovaní pokusu.

Pozitívne výsledky *in vitro* testu chromozómovej odchýlky u cicavcov naznačujú, že testovacia látka vyvoláva štrukturálne chromozómové odchýlky v kultúrach somatických buniek cicavcov. Negatívne výsledky naznačujú, že v testovacích podmienkach testovacia látka neindukuje chromozómové odchýlky v kultúrach somatických buniek cicavcov.

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu zahŕňa nasledujúce informácie:

Rozpúšťadlo/nosič:

— zdôvodnenie výberu nosiča,

— rozpustnosť a stabilita testovacej látky v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa.

Bunky:

— typ a zdroj buniek,

— karyotyp a vhodnosť použitého typu bunky,

— neprítomnosť mykoplazmy, ak je to vhodné,

— informácie o dĺžke cyklu bunky,

— pohlavie darcov krvi, celej krvi alebo separovaných lymfocytov, použitý mitogén,

— počet prechodov, ak je to vhodné,

— metódy udržiavania bunkovej kultúry, ak je to vhodné,

— modálne číslo chromozómov.

Podmienky testov:

— identita látky zadržiavajúcej metafázu, jej koncentrácia a trvanie expozície bunky,

— zdôvodnenie výberu koncentrácií a počtu kultúr vrátane napríklad údajov o cytotoxicite a obmedzeniach rozpustnosti, ak sú dostupné,

— skladba média, koncentrácia CO_2, ak je to vhodné,

▼B

— koncentrácia testovacej látky,

— objem nosiča a pridanej testovacej látky,

— inkubačná teplota,

— inkubačná doba,

— trvanie ošetrovania,

— hustota buniek pri vysádzaní, ak je to vhodné,

— typ a zloženie systému metabolickej aktivácie vrátane kritérií prijateľnosti,

— pozitívne a negatívne kontrolné kultúry,

— metódy prípravy vzoriek,

— kritériá na hodnotenie odchýlok,

— počet analyzovaných metafáz,

— metódy merania toxicity,

— kritériá na hodnotenie pokusov ako pozitívne, negatívne alebo nejasné.

Výsledky:

— známky toxicity, napríklad stupeň hromadenia, údaje o cykle bunky, počty buniek, mitotický index,

— príznaky zrážania,

— údaje o pH a osmolalite média, ak sú stanovené,

— definícia odchýlok vrátane trhlín,

— počet buniek s chromozómovými odchýlkami a typ chromozómových odchýlok uvedené oddelene pre každú ošetrenú a kontrolnú kultúru,

— zmeny v ploidii, ak sa pozorujú,

— vzťah medzi dávkou a reakciou, ak je to možné,

— štatistické analýzy, ak existujú,

— údaje o negatívnej (rozpúšťadlo/nosič) a pozitívnej kultúre,

— historické údaje o negatívnej (rozpúšťadlo/nosič) a pozitívnej kultúre, s rozsahmi, strednými hodnotami a štandardnými odchýlkami.

Rozbor výsledkov

Závery

4. **ODKAZY**

(1) Evans, H. J. (1976), Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens, in: Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection, vol. 4, Hollander, A. (ed), Plenum Press, New York a Londýn, s. 1 – 29.

(2) Ishidate, M. Jr. a Sofumi, T. (1985), The *In Vitro* Chromosomal Aberration Test Using Chinese Hamster Lung (CHL) Fibroblast Cells in Culture, in: Progress in Mutation Research, vol. 5, Ashby, J. et al. (eds), Elsevier Science Publishers, Amsterdam – New York – Oxford, s. 427 – 432.

▼B

(3) Galloway, S. M., Armstrong, M. J., Reuben, C, Colman, S., Brown, B., Cannon, C, Bloom, A. D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G. H., Resnick, M. A., Anderson, G. a Zeiger, E. (1978), Chromosome Aberration and Sister Chromatic Exchanges in Chinese Hamster Ovary Cells: Evaluation of 108 chemicals, Environ, Molec. Mutagen, 10 (suppl. 10) s. 1-175.

(4) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R R, Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. a Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, Mutation Res., 257, s. 147 – 204.

(5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. a Okumura, K. (1992), Clastogenicity of Low pH to Various Cultured Mammalian Cells, Mutation. Res., 268, s. 297 – 305.

(6) Ames, B. N, McCann, J. a Yamasaki, E. (1975), Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/-Mammalian Microsome Mutagenicity Test, Mutation Res., 31, s. 347 – 364.

(7) Maron, D. M a Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, Mutation Res., 113, s. 173 – 215.

(8) Natarajan, A. T., Tates, A. D., van Buul, P. P. W., Meyers, M. a de Vogel, N. (1976), Cytogenetic Effects of Mutagen/-Carcinogens after Activation in a Microsomal System *In Vitro,* I. Induction of Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchange by Dietylnitrozamine (DEN) a Dimetylnitrozamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat Liver Microsomes, Mutation Res., 37, s. 83 – 90.

(9) Matsuoka, A., Hayashi, M. a Ishidate, M. Jr. (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *in Vitro*, Mutation Res., 66, s. 277 – 290.

(10) Elliot, B. M., Combes, R D. Elcombe, C. R, Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. a Wolf, R. C. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternative to Aroclor 1254-Induced S9, *In Vitro* Genotoxicity Assays, Mutagenesis, 7, s. 175 – 177.

(11) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. a Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyl as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: de Serres, F. J, Fouts, J. R, Bend, J. R a Philpot, R M (eds), In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis testing, Elsevier, North Holland, s. 85 – 88.

(12) Galloway, S. M., Aardema, M. J., Ishidate, M. Jr., Ivett, J. L., Kirkland, D. I, Morita, T., Mosesso, P., Sofumi, T. (1994) Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, Mutation Res., 312, s. 241 – 261.

(13) Richardson, C, Williams, D. A., Allen, J. A., Amphlett, G., Chanter, D. O. a Phillips, B. (1989), Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays, in: Statistical Evaluation of Mutagenicity test Data, Kirkland, D. J. (ed), Cambridge University Press, Cambridge, s. 141 – 154.

(14) Soper, K. A. a Galloway, S. M. (1994), Replicate Flasks are not Necessary for *in Vitro* Chromosome Aberration Assays in CHO Cells, Mutation Res., 312, s. 139 – 149.

(15) Krahn, D. F. Barsky, F. C. a McCooey, K. T. (1982), CHO/-HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, in: Tice, R R., Costa, D. L., Schaich, K. M. (eds.), Genotoxic Effects of Airborne Agents, New York, Plenum, s. 91 – 103.

▼B

(16) Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. a Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay, Environmental Mutagenesis, 5, s. 795 – 801.

(17) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese Hamster cells during Alpha Radiation Induced G2 arrest, Mutation Res., 119, s. 403 – 413.

(18) Huang, Y., Change, C, Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, Cancer Res., 43, s. 1362 – 1364.

▼B

B.11. MUTAGÉNNOSŤ – *IN VIVO* TEST CHROMOZÓMOVEJ ODCHÝLKY V KOSTNEJ DRENI CICAVCOV

1. METÓDA

Táto metóda je obdobou metódy OECD TG 475 *in vivo* testu chromozómovej odchýlky v kostnej dreni cicavcov (1997).

1.1. ÚVOD

In vivo test chromozómovej odchýlky sa používa na zisťovanie štrukturálnych chromozómových odchýlok vyvolaných testovacou látkou v kostnej dreni zvierat, zvyčajne hlodavcov (1) (2) (3) (4). Štrukturálne chromozómové odchýlky sa vyskytujú v dvoch typoch, chromozómové alebo chromatidové. Zvýšenie hladiny polyploidie môže naznačovať, že chemikália má potenciál indukovať numerické odchýlky. Väčšina chemických mutagénov indukuje odchýlky chromatidového typu, vyskytujú sa však aj odchýlky chromozómového typu. Chromozómové mutácie a podobné udalosti sú príčinou mnohých ľudských genetických chorôb a existujú dostatočné dôkazy o tom, že chromozómové mutácie a podobné udalosti spôsobujúce zmeny onkogénov a génov na potláčanie nádorov sú prítomné pri výskyte rakoviny u ľudí a v pokusných systémoch.

Pri tomto teste sa zvyčajne používajú hlodavce. Cieľovým tkanivom pri teste je kostná dreň, pretože je to vysoko vaskularizované tkanivo a obsahuje populáciu rýchlo cyklujúcich buniek, ktoré sa dajú jednoducho oddeliť a spracovať. Iné druhy a cieľové tkanivá sa pri tomto teste nepoužívajú.

Tento test chromozómovej odchýlky je osobitne relevantný pre hodnotenie mutagénnych rizík, pretože umožňuje zváženie faktorov *in vivo* metabolizmu, farmakokinetiky a opravných procesov DNA, hoci tieto sa môžu od druhu k druhu a od tkaniva k tkanivu líšiť. *In vivo* test je tiež užitočný pre ďalšie skúmanie mutagénnych účinkov zistených *in vitro* testom.

Ak existujú dôkazy, že testovacia látka alebo reaktívny metabolit nedosiahne cieľové tkanivo, nie je vhodné tento test použiť.

Pozri tiež všeobecný úvod k časti B.

1.2. DEFINÍCIE

Odchýlka chromatidového typu: štrukturálne chromozómové poškodenie prejavujúce sa ako pretrhnutie jednotlivých chromatidov alebo pretrhnutie a spojenie medzi chromatidmi.

Odchýlka chromozómového typu: štrukturálne chromozómové poškodenie prejavujúce sa ako pretrhnutie alebo pretrhnutie a opätovné spojenie oboch chromatidov na rovnakom mieste.

Endoreduplikácia: proces, v ktorom po S perióde replikácie DNA jadro neprechádza do mitózy, ale začína novú S periódu. Výsledkom sú chromozómy so 4, 8, 16... chromatidmi.

Trhlina: achromatická lézia, menšia ako šírka jedného chromatidu, s minimálnym posunutím chromatidov.

Číselná (numerická) odchýlka: zmena v počte chromozómov v porovnaní s normálnou číselnou (numerickou) charakteristikou použitých buniek.

▼B

Polyploidia: násobok haploidného počtu chromozómov (*n*) odlišný od počtu diploidov (t. j. 3n, 4n atď.)

Štrukturálna odchýlka: zmena v chromozómovej štruktúre rozpoznateľná mikroskopickým skúmaním metafázového štádia delenia buniek, pozorovaná ako vynechania a fragmenty, vnútorné zmeny alebo zámeny.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Zvieratá sa exponujú testovacej látke vhodnou expozíciou a utratia sa vo vhodnom čase po ošetrení. Pred utratením sa zvieratá ošetria prostriedkom zastavujúcim metafázu (napríklad Colcemidom® alebo colchicinom). Následne sa z kostnej drene urobia chromozómové prípravky, zafarbia sa a pri metafázových bunkách sa analyzujú chromozómové odchýlky.

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Prípravné práce**

1.4.1.1. *Výber živočíšnych druhov*

Bežne sa používajú krysy, myši a čínske morčatá, hoci použiť sa dajú akékoľvek vhodné druhy cicavcov. Vyberajú sa bežne používané laboratórne rody mladých zdravých dospelých zvierat. Na začiatku štúdie by mala byť hmotnostná variácia zvierat minimálna a nemala by presiahnuť ± 20 % strednej hmotnosti každého pohlavia.

1.4.1.2. *Podmienky umiestnenia a kŕmenia*

Používajú sa všeobecné podmienky uvedené vo všeobecnom úvode k časti B, cieľovou hodnotou pre vlhkosť je 50 % – 60 %.

1.4.1.3. *Príprava zvierat*

Zdravé, mladé, dospelé zvieratá sa náhodne rozdelia do kontrolných a pokusných skupín. Klietky sú umiestnené tak, aby sa minimalizovali možné účinky vyplývajúce z rozmiestnenia klietok. Zvieratá sa jednotlivo označia. Zvieratá sa aklimatizujú na laboratórne podmienky najmenej päť dní.

1.4.1.4. *Príprava dávok*

Pevné testovacie látky sa rozpúšťajú alebo ukladajú v príslušných rozpúšťadlách alebo nosičoch, a ak je to vhodné, rozrieďujú sa pred podávaním dávok zvieratám. Kvapalné testovacie látky sa podávajú priamo alebo pred podávaním rozriedené. Používajú sa čerstvé prípravky testovacej látky, pokiaľ údaje o stabilite nepoukazujú na vhodnosť uskladnenia.

1.4.2. **Podmienky testov**

1.4.2.1. *Rozpúšťadlo/nosič*

Rozpúšťadlo/nosič by nemalo mať toxické účinky v používaných úrovniach dávok a nemali by chemicky reagovať s testovacou látkou. Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by malo byť podporené referenčnými údajmi označujúcimi ich kompatibilitu. Odporúča sa zvážiť, pokiaľ je to možné, použitie vodného rozpúšťadla/nosiča.

▼B

1.4.2.2. *Kontrolné skupiny*

Pri každom pokuse sa pre každé pohlavie vytvoria pozitívne a negatívne (rozpúšťadlo/nosič) kontrolné skupiny. Okrem podávania testovacej látky sa so zvieratami v kontrolných skupinách zaobchádza rovnakým spôsobom ako s pokusnými zvieratami.

Pozitívna kontrolná skupina vytvára štrukturálne odchýlky *in vivo* pri úrovniach expozície, pri ktorých sa očakáva zistiteľný nárast na pozadí. Dávky pozitívnej kontrolnej skupiny sa volia tak, aby účinky boli zjavné, ale aby pozorovateľovi priamo neodhaľovali identitu kódovaných vzoriek. Je prijateľné, aby sa pozitívnym kontrolným skupinám látky podávali spôsobom odlišným od testovacej látky a vzorky z nich sa odoberali iba raz. Možno zvážiť použitie príbuzných chemikálií pre pozitívnu kontrolnú skupinu v triede chemikálií. Príklady látok pre pozitívnu kontrolnú skupinu látok:

Látka	Číslo CAS	Číslo EINECS
etyl metánsulfonát	62-50-0	200-536-7
etylnitrozmočovina	759-73-9	212-072-2
mytomicin C	50-07-7	200-008-6
cyklofosfamid monohydrát cyklofosfamidu	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
trietylénmelamín	51-18-3	200-083-5

Pre každý odber vzoriek sa odoberú vzorky aj z negatívnych kontrolných skupín ošetrených rozpúšťadlom alebo nosičom a inak ošetrovaných rovnakým spôsobom ako pokusné skupiny, pokiaľ nie sú z historických kontrolných údajov dostupné údaje o variabilite medzi zvieratami a frekvenciách buniek s chromozómovou odchýlkou. Ak sa pre negatívne kontrolné skupiny používa jeden odber vzorky, najvhodnejším časom je prvý čas odberu. Používajú sa aj neošetrené kontrolné skupiny, pokiaľ neexistujú historické kontrolné údaje demonštrujúce, že vybrané rozpúšťadlo alebo nosič nespôsobujú žiadne rušivé alebo mutagénne účinky.

1.5. POSTUP

1.5.1. **Počet a pohlavie zvierat**

Každá pokusná a kontrolná skupina obsahuje najmenej päť analyzovateľných zvierat každého pohlavia. Ak v čase uskutočnenia štúdie sú dostupné údaje zo štúdií rovnakých druhov a používajúce rovnaké cesty expozície, ktoré ukazujú, že neexistujú významné rozdiely v toxicite medzi pohlaviami, stačí aj testovanie jedného pohlavia. Ak je expozícia chemikálií na ľudí závislá od pohlavia, ako napríklad pri niektorých farmaceutických prípravkoch, test sa uskutoční na zvieratách príslušného pohlavia.

1.5.2. **Harmonogram ošetrovania**

Testovacie látky sa podávajú pri jednom ošetrení. Testovacie látky sa tiež môžu podávať v dvoch dávkach, t. j. dve ošetrenia v ten istý deň niekoľko hodín po sebe na uľahčenie podania veľkého objemu látky. Iné dávkovacie režimy sa vedecky zdôvodnia.

▼B

Vzorky sa odoberajú v dvoch rôznych časoch po ošetrení v jeden deň. Pre hlodavce je prvým intervalom odberu vzorky 1,5-násobok dĺžky bežného bunkového cyklu (zvyčajne 12 – 18 hodín) po ošetrení. Keďže čas potrebný na strávenie a metabolizmus testovacej látky, ako aj jej účinky na kinetiku bunkového cyklu môžu ovplyvniť optimálny čas na zistenie chromozómovej odchýlky, odporúča sa neskoršie odobratie vzorky 24 hodín po prvom čase odberu vzorky. Ak sa používajú dávkovacie režimy dlhšie ako jeden deň, používa sa jeden odber vzorky pri 1,5-násobku dĺžky bežného bunkového cyklu po poslednom ošetrení.

Pred utratením sa zvieratám podáva injekčne intraperitoneálne potrebná dávka prostriedku zastavujúceho metafázu (napríklad Colcemid® alebo colchicin). Po uplynutí potrebného času sa následne odoberajú od zvierat vzorky. Pre myši je tento čas približne 3 – 5 hodín; pre čínske morčatá približne 4 – 5 hodín. Bunky sa zbierajú z kostnej drene a analyzujú sa chromozómové odchýlky.

1.5.3. **Úrovne dávok**

Ak sa z dôvodu nedostatku vhodných údajov uskutoční štúdia na zistenie rozsahu, vykoná sa v rovnakom laboratóriu s použitím rovnakého druhu, rodu, pohlavia a dávkovacieho režimu ako v hlavnej štúdii (5). Ak sa vyskytuje toxicita, pre prvý odber vzorky sa používajú tri úrovne dávok. Tieto úrovne dávok pokrývajú rozsah od maximálnej po malú alebo žiadnu toxicitu. Pri neskoršom odbere vzorky sa používa len najvyššia dávka. Najvyššia dávka sa definuje ako známky toxicity z dávky na takej úrovni, že vyššie úrovne dávkovania založené na rovnakom dávkovacom režime by pravdepodobne spôsobili úmrtnosť. Látky so špecifickými biologickými aktivitami pri nízkych netoxických dávkach (ako napríklad hormóny a mitogény) môžu byť výnimkou kritéria stanovenia dávky a hodnotia sa z prípadu na prípad. Najvyššia dávka sa tiež definuje ako dávka, ktorá spôsobuje určité známky toxicity v kostnej dreni (napríklad: vyššie ako 50 % zníženie mitotického indexu).

1.5.4. **Limitný test**

Ak test pri jednej úrovni dávky najmenej 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti pri jednom podaní alebo pri dvoch podaniach v jeden deň nevyvoláva žiadne toxické účinky a ak sa neočakáva genotoxicita na základe údajov zo štrukturálne príbuzných látok, úplná štúdia pri použití troch úrovní dávkovania sa nepovažuje za potrebnú. Pre štúdie s dlhším trvaním je limitnou dávkou 2 000 mg/kg/telesná hmotnosť/deň pre podávanie trvajúce maximálne 14 dní a 1 000 mg/kg/telesná hmotnosť/deň pre podávanie trvajúce viac ako 14 dní. Očakávaná expozícia ľudí môže naznačovať potrebu vyššej úrovne dávky pri použití limitného testu.

1.5.5. **Podávanie dávok**

Testovacia látka sa zvyčajne podáva plnením žalúdka sondou s použitím žalúdočnej rúrky alebo vhodnej intubačnej kanyly, alebo intraperitoneálnou injekciou. Iné cesty expozície sú prijateľné len so zdôvodnením. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže naraz podávať žalúdočnou sondou alebo injekciou závisí od veľkosti testovacieho zvieraťa. Objem by nemal presiahnuť 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Použitie vyšších objemov sa musí zdôvodniť. Okrem dráždivých alebo žieravých látok, ktoré bežne odhalia zhoršené účinky s vyššími koncentráciami, sa variabilita testovacieho objemu minimalizuje upravením koncentrácie na zabezpečenie stáleho objemu na všetkých úrovniach dávok.

▼B

1.5.6. **Príprava chromozómov**

Ihneď po utratení sa získava kostná dreň, ktorá sa vystaví hypotonickému roztoku a fixuje sa. Bunky sa potom umiestnia na sklíčka a zafarbia.

1.5.7. **Analýza**

Mitotický index sa stanovuje ako meradlo cytotoxicity aspoň na 1 000 bunkách na jedno zviera pre všetky pokusné zvieratá (vrátane pozitívnej kontrolnej skupiny) a pre neošetrené negatívne kontrolné zvieratá.

Pre každé zviera sa analyzuje najmenej 100 buniek. Tento počet možno znížiť pri pozorovaní vysokého počtu odchýlok. Všetky sklíčka vrátane sklíčok z negatívnych a pozitívnych kontrolných skupín sa pred mikroskopickou analýzou nezávisle označia kódmi. Keďže postupy prípravy sklíčok často ústia do pretrhnutia časti metafázy so stratou chromozómov, označené bunky by mali obsahovať počet centromér rovnajúci sa hodnote 2n ± 2.

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje o jednotlivých zvieratách sa uvádzajú v tabuľkovej forme. Experimentálnou jednotkou je jedno zviera. Pre každé zviera sa hodnotí počet buniek, počet odchýlok na bunku a percento buniek so štrukturálnou chromozómovou odchýlkou/odchýlkami. Rôzne typy štrukturálnych chromozómových odchýlok sa uvádzajú v zozname s ich číslami a frekvenciami pre experimentálne a kontrolné kultúry. Trhliny sa zaznamenávajú oddelene a uvádzajú sa, ale zvyčajne sa neudávajú pri celkovej frekvencii odchýlok. Ak neexistujú dôkazy rozdielov medzi reakciami rôznych pohlaví, údaje z oboch pohlaví sa môžu kombinovať pre štatistickú analýzu.

2.2. HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Pre stanovenie pozitívneho výsledku existuje niekoľko kritérií, ako napríklad nárast relatívneho počtu buniek s chromozómovými odchýlkami spojený s dávkou alebo jasný nárast počtu buniek s odchýlkami v jednej dávkovacej skupine pri jednom odbere vzorky. Najprv sa zvažuje biologická relevantnosť výsledkov. Ako pomôcka sa pri hodnotení výsledkov testov používajú štatistické metódy (6). Nejasné výsledky sa objasňujú ďalším testovaním, najlepšie použitím modifikácie pokusných podmienok.

Nárast polyploidie môže naznačovať, že testovacia látka má potenciál indukovať číselné chromozómové odchýlky. Nárast endoreduplikácie môže naznačovať, že testovacia látka má potenciál brzdiť priebeh bunkového cyklu (7) (8).

Hoci väčšina pokusov poskytne jasne pozitívne alebo negatívne výsledky, v zriedkavých prípadoch údaje vylúčia konečný verdikt o aktivite testovacej látky.

▼B

Výsledky môžu ostať nejasné alebo spochybniteľné bez ohľadu na počet opakovaní pokusu.

Pozitívne výsledky *in vivo* testu chromozómovej odchýlky naznačujú, že určitá látka vyvoláva štrukturálne chromozómové odchýlky v kostnej dreni testovaného druhu.

Negatívne výsledky naznačujú, že v testovacích podmienkach testovacia látka neindukuje chromozómové odchýlky v kostnej dreni testovaného druhu.

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu zahŕňa nasledujúce informácie:

Rozpúšťadlo/nosič:

— zdôvodnenie výberu nosiča,

— rozpustnosť a stálosť testovacej látky v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa.

Testované zvieratá:

— použitý druh/kmeň,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky chovu, strava atď.,

— individuálna hmotnosť zvierat na začiatku testu vrátane rozsahu telesnej hmotnosti, strednej hodnoty a štandardnej odchýlky pre každú skupinu.

Podmienky testov:

— pozitívne a negatívne (rozpúšťadlo/nosič) kontrolné skupiny,

— údaje zo štúdie na zistenie rozsahu, ak sa uskutočnila,

— zdôvodnenie výberu konečnej úrovne,

— podrobnosti o príprave testovacej látky,

— podrobnosti o podávaní testovacej látky,

— zdôvodnenie výberu spôsobu podávania,

— metódy overovania, že testovacia látka dosiahla všeobecný vnútorný obeh alebo cieľové tkanivo, ak je to vhodné,

— konverzia z koncentrácie testovacej látky v strave/vode (ppm) na samotnú dávku (mg/kg/telesná hmotnosť/deň), ak je to vhodné,

— podrobnosti o kvalite stravy a vody,

— metódy merania toxicity,

▼B

— identita látky zastavujúcej metafázu, jej koncentrácia a trvanie podávania,

— metódy prípravy sklíčok,

— kritériá na hodnotenie odchýlok,

— počet analyzovaných buniek na jedno zviera,

— kritériá na hodnotenie pokusov ako pozitívne, negatívne alebo nejasné.

Výsledky:

— známky toxicity,

— mitotický index,

— typ a počet odchýlok uvedený jednotlivo za každé zviera,

— celkový počet odchýlok na skupinu so strednou hodnotou a štandardnou odchýlkou,

— počet buniek s odchýlkami na skupinu so strednou hodnotou a štandardnou odchýlkou,

— zmeny v ploidii, ak sa pozorovali,

— vzťah medzi dávkou a reakciou, ak je to možné,

— štatistické analýzy, ak sa použili,

— údaje o negatívnych kontrolných skupinách,

— historické údaje o negatívnych kontrolných skupinách s rozsahmi, strednými hodnotami a štandardnými odchýlkami,

— údaje o pozitívnych kontrolných skupinách.

Rozbor výsledkov

Závery

4. **ODKAZY**

(1) Adler, I. D. (1984), Cytogenetic Tests In Mammals, in: Mutagenicity Testing: a Practical Approach, S. Venitt a J. M. Parry (eds), IRL Press, Oxford, Washington D. C, s. 275 – 306.

(2) Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F. a Shelby, M. (1987), Mammalian *in vivo* Cytogenetic Assays. Analysis of Chromosome Aberration in Bone Marrow Cells, in: Mutation Res., 189, s. 157 – 165.

(3) Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D. G., Bootman, J. a Henderson, L. (1990), *In vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures, UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part I revised, Cambridge University Press, Cambridge, new York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 115 – 141.

(4) Tice, R. R, Hayashi, M., MacGregaro, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H, Holden, H. E., Kirsch-Volders, M., Oleson Jr., F. B., Pacchierotti, F., Preston, R. J., Romagna, F., Shimada, H, Soutou, S. a Vannier, B., (1994) Report from the Working Group on the *in vivo* Mammalian Bone Marrow Chromosom Aberration Test, Mutation Res., 312, s. 305 – 312.

(5) Fielder, R I, Allen, J. A., Boobis, A. R, Botham, P. A., Doe, I, Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. a Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in *In vivo* Mutagenicity Assays, Mutagenesis, 7, s. 313 – 319.

▼B

(6) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R, Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R, Richold, M., Papworth, D. G. a Savage, J. R. K. (1989), Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays, in: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report Part III, Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, D. J. Kirkland (ed), Cambridge University Press, Cambridge, s. 184 – 232.

(7) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese Hamster Cells during Alpha Radiation Induced G2 Arrest, Mutation Res., 119, s. 403 – 413.

(8) Huang, Y., Change, C. a Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin Induced Endoreduplication in Chinese Hamster Cells, Cancer Res., 43, s. 1362 – 1364.

▼B

B.12. MUTAGÉNNOSŤ – *IN VIVO* TEST MIKROJADRA ERYTROCYTU U CICAVCOV

1. METÓDA

Táto metóda je obdobou OECD TG 474 *in vivo* testu mikrojadra erytrocytu u cicavcov (1997).

1.1. ÚVOD

In vivo test mikrojadra erytrocytu u cicavcov sa používa na zisťovanie poškodenia vyvolaného testovacou látkou na chromozómoch alebo mitotickom aparáte erytroblastov analýzou erytrocytov odobratých z kostnej drene a/alebo periferálnych krvných buniek zvierat, zvyčajne hlodavcov.

Účelom testu mikrojadra je identifikovať látky, ktoré spôsobujú cytogenetické poškodenie s tvorbou mikrojadier obsahujúcich zaostávajúce chromozómové fragmenty alebo celé chromozómy.

Keď sa erytroblast kostnej drene vyvinie na polychromatický erytrocyt, hlavné jadro sa odpudzuje; akýkoľvek mikronukleus, ktorý sa vytvoril, môže ostať pozadu v inak anukleovanej cytoplazme. Vizualizácia mikrojadier je v týchto bunkách jednoduchšia, pretože nemajú hlavné jadro. Nárast frekvencie mikronukleovaných polychromatických erytrocytov u pokusných zvierat je indikáciou vyvolaného chromozómového poškodenia.

Pri tomto teste sa zvyčajne používa kostná dreň hlodavcov, keďže polychromatické erytrocyty sa tvoria v tomto tkanive. Meranie mikronukleovaných nezrelých (polychromatických) erytrocytov v periférnej krvi je rovnako prijateľné pre akékoľvek druhy, pri ktorých sa preukázala neschopnosť sleziny odstraňovať mikronukleované erytrocyty alebo ktoré vykázali rovnakú citlivosť na zistenie činiteľov, ktoré spôsobujú štrukturálne alebo numerické chromozómové odchýlky. Mikrojadrá sa dajú rozlíšiť podľa niekoľkých kritérií. Ide napríklad o identifikáciu prítomnosti alebo neprítomnosti kinetochoru alebo centromerickej DNA v mikrojadrách. Frekvencia mikronukleovaných nezrelých (polychromatických) erytrocytov je principiálnym hlavným parametrom. Počet zrelých (normochromatických) erytrocytov v periférnej krvi, ktorá obsahuje mikrojadrá medzi daným počtom zrelých erytrocytov, sa tiež môže použiť ako parameter pokusu, ak tento prebieha štyri a viac týždňov.

Tento *in vivo* test mikrojadra cicavcov je pre hodnotenie mutagénneho rizika osobitne relevantný, pretože umožňuje zváženie faktorov *in vivo* metabolizmu, farmakokinetiky a opravných procesov DNA, hoci tieto sa môžu z druhu na druh, z tkaniva na tkanivo a z géna na gén líšiť. *In vivo* test je tiež užitočný pre ďalšie skúmanie mutagénnych účinkov zistených *in vitro* systémom.

Ak existujú dôkazy, že testovacia látka alebo reaktívny metabolit nedosiahne cieľové tkanivo, nie je vhodné tento test použiť.

Pozri tiež všeobecný úvod k časti B.

▼B

1.2. DEFINÍCIE

Centromera (kinetochora): oblasť/oblasti chromozómu, s ktorými sú spojené vretenové vlákna počas delenia buniek, umožňujúce riadny pohyb dcérskych chromozómov k pólom dcérskych buniek.

Mikrojadrá: malé jadrá oddelené od hlavných jadier buniek a pridaných k nim, vytvárané počas telofázy mitózy (meiózy) zaostávajúcimi chromozómovými fragmentmi alebo celými chromozómami.

Normochromatický erytrocyt: zrelý erytrocyt, ktorý neobsahuje ribozómy a od nezrelých polychromatických erytrocytov sa líši škvrnami typickými pre ribozómy.

Polychromatický erytrocyt: nezrelý erytrocyt v medzištádiu vývoja, ktorý stále obsahuje ribozómy, a preto sa od zrelých normochromatických erytrocytov líši škvrnami typickými pre ribozómy.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Zvieratá sú vystavené testovacej látke príslušným spôsobom. Ak sa používa kostná dreň, zvieratá sa utratia vo vhodnom čase po podaní látky, kostná dreň sa vyberie a prípravky (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) sa zhotovia a zafarbia. Ak sa používa periférna krv, odoberá sa vo vhodnom čase po podaní látky a prípravky (4) (8) (9) (10) sa zhotovia a zafarbia. Pre štúdie s perifémou krvou by medzi poslednou expozíciou a zberom buniek mal ubehnúť minimálny čas. Preparáty sa analyzujú na prítomnosť mikrojadier.

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Prípravné práce**

1.4.1.1. *Výber živočíšneho druhu*

Ak sa používa kostná dreň, odporúča sa použiť krysy a myši, hoci použiť sa dajú akékoľvek vhodné druhy cicavcov. Ak sa používa periférna krv, odporúča sa použiť myši. Použiť sa však dajú akékoľvek vhodné druhy cicavcov za predpokladu, že ide o druh, v ktorom slezina neodstraňuje mikronukleované erytrocyty, alebo druh, ktorý vykazuje primeranú citlivosť na zistenie činiteľov, ktoré spôsobujú štrukturálne alebo číselné chromozómové odchýlky. Vyberajú sa bežne používané laboratórne kmene mladých zdravých dospelých zvierat. Na začiatku štúdie by mala byť hmotnostná variácia zvierat minimálna a nemala by presiahnuť ± 20 % strednej hmotnosti každého pohlavia.

1.4.1.2. *Podmienky umiestnenia a kŕmenia*

Používajú sa všeobecné podmienky uvedené vo všeobecnom úvode k časti B, cieľovou hodnotou pre vlhkosť je 50 % – 60 %.

▼B

1.4.1.3. *Príprava zvierat*

Zdravé mladé dospelé zvieratá sa náhodne rozdelia do kontrolných a pokusných skupín. Zvieratá sa jednotlivo označia. Zvieratá sa aklimatizujú na laboratórne podmienky najmenej päť dní. Klietky sú umiestnené tak, aby sa minimalizovali možné účinky vyplývajúce z rozmiestnenia klietok.

1.4.1.4. *Príprava dávok*

Pevné testovacie látky sa rozpúšťajú alebo ukladajú v príslušných rozpúšťadlách alebo nosičoch, a ak je to vhodné, rozrieďujú sa pred podávaním dávok zvieratám. Kvapalné testovacie látky sa podávajú priamo alebo pred podávaním rozriedené. Používajú sa čerstvé prípravky testovacej látky, pokiaľ údaje o stabilite nepoukazujú na vhodnosť uskladnenia.

1.4.2. **Podmienky testov**

1.4.2.1. *Rozpúšťadlo/nosič*

Rozpúšťadlo/nosič by nemal vyvolávať toxické účinky v používaných úrovniach dávok a nemal by chemicky reagovať s testovacou látkou. Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by mali podporiť referenčné údaje označujúce ich kompatibilitu. Odporúča sa zvážiť, pokiaľ je to možné, použitie vodného rozpúšťadla/nosiča.

1.4.2.2. *Kontrolné skupiny*

Pri každom pokuse sa pre každé pohlavie vytvoria pozitívne a negatívne (rozpúšťadlo alebo nosič) kontrolné skupiny. Okrem podávania testovacej látky sa so zvieratami v kontrolných skupinách zaobchádza rovnakým spôsobom ako s pokusnými zvieratami.

Pozitívne kontrolné skupiny vytvárajú mikrojadrá *in vivo* v úrovniach expozície, pri ktorých sa očakáva zistiteľný nárast na pozadí. Dávky pozitívnej kontrolnej skupiny sa volia tak, aby účinky boli zjavné, ale aby pozorovateľovi priamo neodhaľovali identitu kódovaných vzoriek. Je prijateľné, aby sa pozitívnym kontrolným skupinám podávali látky spôsobom odlišným od testovacej látky a vzorky z nich sa odoberali iba raz. Možno zvážiť použitie príbuzných chemikálií pre pozitívnu kontrolnú skupinu v triede chemikálií, ak sú tieto dostupné. Príklady látok pre pozitívnu kontrolnú skupinu:

Látka	Číslo CAS	Číslo EINECS
etylmetánsulfonát	62-50-0	200-536-7
N-etyl-N-nitrozmočovina	759-73-9	212-072-2
mytomycín C	50-07-7	200-008-6
cyklofosfamid monohydrát cyklofosfamidu	50-18-0 055-19-2	200-015-4
trietylénmelamín	51-18-3	200-083-5

▼B

Pre každý odber vzoriek sa odoberú aj vzorky z negatívnych kontrolných skupín ošetrených rozpúšťadlom alebo nosičom a inak ošetrovaných rovnakým spôsobom ako pokusné skupiny, pokiaľ nie sú z historických kontrolných údajov dostupné údaje o variabilite medzi zvieratami a frekvenciách buniek s chromozómovou odchýlkou. Ak sa pre negatívne kontrolné skupiny používa jeden odber vzorky, najvhodnejším časom je prvý odber. Používajú sa aj neošetrené kontrolné skupiny, pokiaľ neexistujú historické kontrolné údaje demonštrujúce, že vybrané rozpúšťadlo alebo nosič nespôsobujú žiadne rušivé alebo mutagénne efekty.

Ak sa používa periférna krv, prijateľná je tiež vzorka pred podaním látky ako súbežná negatívna kontrola, ale len v prípadoch krátkych štúdií periférnej krvi (napríklad: 1 – 3 dávky), keď výsledné údaje sú v očakávanom rozsahu pre historickú kontrolu.

1.5. POSTUP

1.5.1. **Počet a pohlavie zvierat**

Každá pokusná a kontrolná skupina obsahuje najmenej päť analyzovateľných zvierat každého pohlavia. Ak v čase uskutočnenia štúdie sú dostupné údaje zo štúdií rovnakých druhov a používajúce rovnaké spôsoby vystavenia, ktoré ukazujú, že neexistujú významné rozdiely v toxicite medzi pohlaviami, stačí aj testovanie jedného pohlavia. Ak expozícia chemikálií na ľudí je závislá od pohlavia, ako napríklad pri niektorých farmaceutických prípravkoch, test sa uskutoční na zvieratách príslušného pohlavia.

1.5.2. **Harmonogram podávania**

Nedá sa odporučiť žiadny štandardný (t. j. jedna, dve alebo tri podania v 24-hodinových intervaloch) harmonogram podávania. Vzorky z predĺžených dávkovacích režimov sú prijateľné, pokiaľ bol pre túto štúdiu preukázaný pozitívny účinok alebo pokiaľ bola pri negatívnej štúdii preukázaná toxicita, alebo ak sa použila limitná dávka a dávkovanie pokračovalo až do času odberu vzorky. Testovacie látky sa tiež môžu podávať v dvoch dávkach, t. j. dve ošetrenia v ten istý deň niekoľko hodín po sebe na uľahčenie podania veľkého objemu látky.

Test sa môže uskutočniť dvoma spôsobmi:

a) zvieratám sa testovacia látka podá raz. Vzorky kostnej drene sa odoberú minimálne dvakrát, nie skôr ako 24 hodín po podaní, ale nie neskôr ako 48 hodín po podaní s primeranými intervalmi medzi odbermi. Uskutočnenie odberu skôr ako 24 hodín po podaní sa zdôvodní. Vzorky periférnej krvi sa odoberú minimálne dvakrát, minimálne 36 hodín po podaní s primeranými intervalmi po odbere, ale nie neskôr ako po 72 hodinách. Pri zistení pozitívnej reakcie pri niektorom odbere nie je ďalší odber vzorky potrebný;

▼B

b) ak sa použijú dve alebo viac dávok za deň (napríklad dve alebo viac dávok v 24-hodinových intervaloch), vzorky sa odoberajú raz medzi 18. a 24. hodinou nasledujúcou po poslednej dávke pri kostnej dreni a raz medzi 36. a 48. hodinou po poslednej dávke pri periférnej krvi (12).

Ak je to relevantné, použijú sa ďalšie intervaly odberu vzoriek.

1.5.3. **Úrovne dávok**

Ak sa z dôvodu nedostatku vhodných údajov uskutoční štúdia na zistenie rozsahu, vykoná sa v rovnakom laboratóriu s použitím rovnakého druhu, rodu, pohlavia a dávkovacieho režimu ako v hlavnej štúdii (13). Ak sa vyskytuje toxicita, pre prvý odber vzorky sa používajú tri úrovne dávok. Tieto úrovne dávok pokrývajú rozsah od maximálnej po malú alebo žiadnu toxicitu. Pri neskoršom odbere vzorky sa používa len najvyššia dávka. Najvyššia dávka sa definuje ako známky toxicity z dávky na takej úrovni, že vyššie úrovne dávok založené na rovnakom dávkovacom režime by pravdepodobne spôsobili úmrtnosť. Látky so špecifickými biologickými aktivitami pri nízkych netoxických dávkach (ako napríklad hormóny a mitogény) môžu byť výnimkou z kritéria stanovenia dávky a hodnotia sa z prípadu na prípad. Najvyššia dávka sa tiež definuje ako dávka, ktorá spôsobuje určité známky toxicity v kostnej dreni (napríklad zníženie podielu nezrelých erytrocytov na celkovom počte erytrocytov v kostnej dreni alebo periférnej krvi).

1.5.4. **Limitný test**

Ak test pri jednej úrovni dávky najmenej 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti pri jednom podaní alebo pri dvoch podaniach v jeden deň nevyvoláva žiadne toxické účinky a ak sa neočakáva genotoxicita na základe údajov zo štrukturálne príbuzných látok, úplná štúdia pri použití troch objemov dávok sa nepovažuje za potrebnú. Pre štúdie s dlhším trvaním je limitnou dávkou 2 000 mg/kg/telesná hmotnosť/deň pre podávanie trvajúce maximálne 14 dní a 1 000 mg/kg/telesná hmotnosť/deň pre podávanie trvajúce viac ako 14 dní. Očakávaná expozícia na ľudí môže naznačovať potrebu vyššej úrovne dávok pri použití limitného testu.

1.5.5. **Podávanie dávok**

Testovacia látka sa zvyčajne podáva plnením žalúdka sondou s použitím žalúdočnej rúrky alebo vhodnej intubačnej kanyly, alebo intraperitoneálnou injekciou. Iné spôsoby expozície sú prijateľné len so zdôvodnením. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže naraz podávať žalúdočnou sondou alebo injekciou, závisí od veľkosti testovacieho zvieraťa. Objem by nemal presiahnuť 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Použitie vyšších objemov sa musí zdôvodniť. Okrem dráždivých alebo žieravých látok, ktoré bežne odhalia zhoršené účinky s vyššími koncentráciami, sa variabilita testovacieho objemu minimalizuje upravením koncentrácie na zabezpečenie stáleho objemu na všetkých úrovniach dávok.

▼B

1.5.6. **Príprava kostnej drene/krvi**

Bunky kostnej drene sa zvyčajne získavajú zo stehennej kosti (femur) alebo holennej kosti (tibia) ihneď po utratení. Zvyčajne sa bunky z týchto kostí odoberú, pripravia a zafarbia použitím bežných metód. Periférna krv sa získava z chvostovej žily alebo inej vhodnej žily. Krvné bunky sa ihneď supravitálne zafarbia (8) (9) (10) alebo sa urobia škvrnové prípravky, ktoré sa následne zafarbia. Použitie špecifického farbiva DNA [napríklad akridínová oranž (14) alebo Hoechst 33258 plus pyronin-Y (15)] môže odstrániť niektoré umelo vzniknuté štruktúry buniek spojené s používaním nešpecifického farbiva DNA. Táto výhoda nedáva predpoklad používania konvenčných farbív (napríklad Giemsa). Použiť sa tiež môžu dodatočné systémy [napríklad celulózne stĺpce na odstránenie nukleovaných buniek (16)], a to za predpokladu, že tieto systémy vykazujú v laboratórnych podmienkach primerané výsledky pri príprave mikrojadier.

1.5.7. **Analýza**

Pre každé zviera sa stanovuje podiel nezrelých erytrocytov na celkovom počte erytrocytov (zrelých plus nezrelých) spočítaním celkovo najmenej 200 erytrocytov pre kostnú dreň a 1 000 erytrocytov pre periférnu krv (17). Všetky sklíčka vrátane sklíčok z negatívnych a pozitívnych kontrolných skupín sa pred mikroskopickou analýzou nezávisle označia kódmi. Na výskyt mikronukleovaných nezrelých erytrocytov sa počíta minimálne 2 000 nezrelých erytrocytov na jedno zviera. Dodatočné informácie možno získať zaznamenávaním zrelých erytrocytov na mikrojadrách. Pri analýze sklíčok by podiel nezrelých erytrocytov na celkovom počte erytrocytov nemal byť menej ako 20 % kontrolnej hodnoty. Ak podávanie trvá bez prestávky štyri a viac týždňov, na výskyt mikrojadier sa počíta minimálne 2 000 zrelých erytrocytov na jedno zviera. Systémy na automatickú analýzu (vizuálna analýza a toková cytometrická analýza bunkových suspenzií) sú prijateľnou alternatívou manuálneho hodnotenia, ak sa príslušne zdôvodnia a potvrdia.

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje o jednotlivých zvieratách sa uvádzajú v tabuľkovej forme. Experimentálnou jednotkou je jedno zviera. Pre každé zviera sa jednotlivo uvádza počet nezrelých erytrocytov, počet mikronukleovaných nezrelých erytrocytov a podiel nezrelých erytrocytov na celkovom počte erytrocytov. Ak podávanie prebieha bez prestávky štyri a viac týždňov, udávajú sa tiež údaje o zrelých erytrocytoch, ak sa zhromažďovali. Pre každé zviera sa udáva podiel nezrelých erytrocytov na celkovom počte erytrocytov, a ak je to vhodné, percentuálny podiel mikronukleovaných erytrocytov. Ak neexistujú dôkazy o rozdieloch medzi reakciami rôznych pohlaví, údaje z oboch pohlaví sa môžu kombinovať pre štatistickú analýzu.

▼B

2.2. HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Pre stanovenie pozitívneho výsledku existuje niekoľko kritérií, ako napríklad nárast relatívneho počtu buniek s chromozómovými odchýlkami spojený s dávkou alebo jasný nárast počtu buniek s odchýlkami v jednej dávkovacej skupine pri jednom odbere vzorky. Najprv sa zvažuje biologická relevantnosť výsledkov. Ako pomôcka sa pri hodnotení výsledkov testov používajú štatistické metódy (18) (19). Nejasné výsledky sa objasňujú ďalším testovaním, najlepšie použitím modifikácie pokusných podmienok.

Testovacia látka, pre ktorú nespĺňajú výsledky vyššie uvedené kritériá, sa pre tento test považuje za nemutagénnu.

Hoci väčšina pokusov poskytne jednoznačne pozitívne alebo negatívne výsledky, v zriedkavých prípadoch údaje vylúčia konečný verdikt o aktivite testovacej látky. Výsledky môžu ostať nejasné alebo spochybniteľné bez ohľadu na počet opakovaní pokusu.

Pozitívne výsledky testu mikrojadier naznačujú, že určitá látka vyvoláva mikrojadrá, ktoré sú výsledkom chromozómového poškodenia alebo poškodenia mitotického aparátu v erytroblastoch testovaného druhu.

Negatívne výsledky naznačujú, že v testovacích podmienkach testovacia látka v nezrelých erytrocytoch testovaného druhu mikrojadrá nevytvára.

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu zahŕňa nasledujúce informácie:

Rozpúšťadlo/nosič:

— zdôvodnenie výberu nosiča,

— rozpustnosť a stabilita testovacej látky v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa.

Testovacie zvieratá:

— použitý druh/kmeň,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky chovu, strava atď.,

— individuálna hmotnosť zvierat na začiatku testu vrátane rozsahu telesnej hmotnosti, strednej hodnoty a štandardnej odchýlky pre každú skupinu.

Podmienky testov:

— pozitívne a negatívne (rozpúšťadlo/nosič) kontrolné skupiny,

— údaje zo štúdie na zistenie rozsahu, ak sa uskutočnila,

▼B

— zdôvodnenie voľby úrovne dávok,

— podrobnosti o príprave testovacej látky,

— podrobnosti o podávaní testovacej látky,

— zdôvodnenie spôsobu podávania,

— metódy overovania, že testovacia látka dosiahla všeobecný vnútorný obeh alebo cieľové tkanivo, ak je to vhodné,

— konverzia z koncentrácie testovacej látky v strave/vode (ppm) na samotnú dávku (mg/kg/telesná hmotnosť/deň), ak je to vhodné,

— podrobnosti o kvalite stravy a vody,

— podrobný opis harmonogramov podávania a odoberania vzoriek,

— metódy prípravy sklíčok,

— metódy merania toxicity,

— kritériá počítania mikronukleovaných nezrelých erytrocytov,

— počet analyzovaných buniek na jedno zviera,

— kritériá na hodnotenie pokusov ako pozitívne, negatívne alebo nejasné.

Výsledky

— známky toxicity,

— podiel nezrelých erytrocytov na celkovom počte erytrocytov,

— počet mikronukleovaných nezrelých erytrocytov jednotlivo pre každé zviera,

— ± stredná hodnota štandardnej odchýlky mikronukleovaných nezrelých erytrocytov na skupinu,

— vzťah medzi dávkou a reakciou, ak je to možné,

— použité štatistické analýzy a metódy,

— údaje o negatívnych kontrolných skupinách,

— údaje o pozitívnych kontrolných skupinách.

— Rozbor výsledkov

— Závery

4. **ODKAZY**

(1) Heddle, J. A. (1973), A Rapid *In vivo* Test for Chromosomal Damage, Mutation Res., 18, s. 187 – 190.

(2) Schmid, W. (1975), The Micronucleus Test, Mutation Res., 31, s. 9 – 15.

(3) Heddle, J. A., Salamone, M. F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. G. a Newell, G. W. (1983), The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity, Mutation Res., 123, s. 61 – 118.

(4) Mavournin, K. H., Blakey, D. H, Cimino, M. C, Salamone, M. F. a Heddle, J. A. (1990), The *In vivo* Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A Report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 239, s. 29 – 80.

▼B

(5) MacGregor, J. T., Schlegel, R, Choy, W. N. a Wehr, C. M. (1983), Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice, in: Developmentsin Science and Practice of Toxicology, ed. A. W. Hayes, R. C. Schnell a T. S. Miya, Elsevier, Amsterdam, s. 555 – 558.

(6) MacGregor, J. T., Heddle, J. A., Hite, M., Margolin, G H., Ramel, C, Salamone, M. F., Tice, R. R. a Wild, D. (1987), Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes, Mutation Res., 189. s. 103 – 112.

(7) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Henika, P. R a Shelby, M. E. (1990), The *in vivo* Erythrocyte Micronucleus Test: Measurement at Steady State Increases Assay Efficiency and Permits Integration with Toxicity Studies, Fund. Appl. Toxicol 14, s. 513 – 522.

(8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofumi, T. a Ishidate, M. Jr. (1990), The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides, Mutation Res., 245, s. 245 – 249.

(9) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (1992). Micronucleus Test with Mouse Peripheral Blood Erythrocytes by Acridine Orange Supravital Staining: The Summary Report of the 5th Collaborative Study by CSGMT/ JEMMS, Mutation Res., 278, s. 83 – 98.

(10) The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT/JEMMS, MMS: The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan) (1995), Protocol Recommended for the Short-term Mouse Peripheral Blood Micronucleus test, Mutagenesis, 10, s. 53 – 159.

(11) Hayashi, M., Tice, R. R, MacGregor, J. T., Anderson, D., Blackey, D. H, Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr., F. B., Pacchicrotti, F., Romagna, F., Shimada, H., Soutou, S. a Vannier, B. (1994), *In vivo* Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay, Mutation Res., 312, s. 293 – 304.

(12) Higashikuni, N. a Soutou, S. (1995), An Optimal Generalised Sampling Time of 30 ± 6 h after Double Dosing in the Mouse Peripheral Micronucleus Test, Mutagenesis, 10, s. 313 – 319.

(13) Fielder, R I, Allen, J. A., Boobis, A. R, Botham, P. A., Doe, I, Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G, Hodson-Walker, G, Morton, D. B., Kirkland, D. J. a Rochold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting *in In vivo* Mutagenicity Assays, Mutagenesis, 7, s. 313 – 319.

(14) Hayashi, M., Sofumi, T. a Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, Mutation Res., 120, s. 241 – 247.

(15) MacGregor, J. T., Wehr, C. M. a Langlois, R. G (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyromin Y, Mutation Res., 120, s. 269 – 275.

(16) Romagna, F. a Staniforth, C. D. (1989), The Automated Bone Marrow Micronucleus Test, Mutation Res., 213, s. 91 – 104.

(17) Gollapudi, B. a McFadden, L. G (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, Mutation Res., 347, s. 97 – 99.

▼B

(18) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G, Bootman, J. a Henderson, L. (1990), *In vivo* Cytogenetic Assays, in: D. J. Kirkland (ed.), Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures, UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part I revised, Cambridge Uniersity Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, s. 115 – 141.

(19) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R, Amphlett, G E., Clare, G, Ferguson, R, Richold, M., Papworth, D. G. a Savage, J. R. K, (1989) Statistical Analysis of *in vivo* Cytogenetic Assays, in:D. J. Kirkland (ed.), Statistical Evaluation of Mutagenecity test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III, D. J. Kirkland (ed), Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Mellbourne, Sydney, s. 184 – 232.

▼B

B.13/14. **MUTAGÉNNOSŤ: BAKTERIÁLNY TEST REVERZNÝCH MUTÁCIÍ**

1. **METÓDA**

Táto metóda je obdobou metódy OECD TG 471 bakteriálneho testu reverzných mutácií (1997).

1.1. ÚVOD

Bakteriálny test reverzných mutácií používa aminokyseliny vyžadujúce kmene *Salmonella typhimurium* a *Escherichia coli* na zistenie bodových mutácií, ktoré zahŕňajú nahradenie, pridanie alebo vymazanie jednej alebo niekoľkých bázových párov DNA (1) (2) (3). Princípom bakteriálneho testu reverzných mutácií je, že zisťuje mutácie, ktoré vracajú do pôvodného stavu mutácie prítomné v testovacích kmeňoch a obnovujú funkčnú schopnosť baktérií syntetizovať esenciálne aminokyseliny. Reverzné baktérie sa zisťujú prostredníctvom ich schopnosti rásť v neprítomnosti aminokyseliny vyžadovanej rodičovským testovacím kmeňom.

Bodové mutácie sú príčinou mnohých ľudských genetických chorôb a existujú dostatočné dôkazy, že bodové mutácie onkogénov a génov na potláčanie nádorov somatických buniek sú prítomné pri výskyte rakoviny u ľudí a pokusných zvierat. Bakteriálny test reverzných mutácií je rýchly, lacný a relatívne ľahko uskutočniteľný. Mnohé z testovacích kmeňov majú viacero vlastností, ktoré spôsobujú ich väčšiu citlivosť na zistenie mutácií vrátane reaktívnych DNA sekvencií na reverzných miestach, zvýšenej bunkovej permeability na veľké molekuly a eliminácie opravných systémov DNA alebo zlepšenia opravných procesov DNA náchylných na chyby. Špecifickosť testovacích kmeňov môže poskytnúť užitočné informácie o typoch mutácií, ktoré sú vyvolané genotoxickými činiteľmi. Dostupná je veľká databáza výsledkov pre rôzne štruktúry pre bakteriálny test reverzných mutácií a boli vyvinuté dobré metódy na testovanie chemikálií s rôznymi fyzikálno-chemickými vlastnosťami vrátane prchavých zmesí.

Pozri tiež všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIE

Test reverzných mutácií buď v *Salmonella typhimurium*, alebo *Escherichia coli* zisťuje mutáciu v kmeni vyžadujúcom aminokyselinu (histidín alebo tryptofán) na vytvorenie kmeňa nezávislého od vonkajšieho prívodu aminokyseliny.

Substitučné mutagény bázového páru sú činitele, ktoré spôsobujú bázovú zmenu DNA. V teste reverzných mutácií sa môže táto zmena odohrať na mieste pôvodnej mutácie alebo na inom mieste bakteriálneho genómu.

Konštrukčné mutagény sú činitele, ktoré spôsobujú pridanie alebo vymazanie jedného alebo viacerých bázových párov DNA, čím menia čítaciu konštrukciu DNA.

▼B

1.3. ÚVODNÉ ÚVAHY

Bakteriálny test reverzných mutácií využíva prokaryotické bunky, ktoré sa od buniek cicavcov odlišujú vo faktoroch, ako je vstrebávanie, metabolizmus, chromozómová štruktúra a opravné procesy DNA. Testy uskutočnené *in vitro* vo všeobecnosti vyžadujú použitie exogénneho zdroja metabolickej aktivácie. *In vitro* systémy metabolickej aktivácie nemôžu plne napodobniť *in vivo* podmienky cicavcov. Test preto neposkytuje priame informácie o mutagénnej a karcinogénnej potencii látky u cicavcov.

Bakteriálny test reverzných mutácií sa bežne používa ako počiatočný prieskum genologickej aktivity, a najmä aktivity vyvolávajúcej bodové mutácie. Rozsiahla databáza ukázala, že mnohé chemikálie, ktoré sú v tomto teste pozitívne, tiež vykazujú mutagénnu aktivitu v iných testoch. Existujú príklady mutagénnych činiteľov, ktoré sa nezistili týmto testom; príčina týchto chýb sa dá pripísať špecifickej povahe zisteného stavu, rozdielom v metabolickej aktivácii alebo rozdielom v biodostupnosti. Na druhej strane faktory, ktoré zvyšujú citlivosť bakteriálneho testu reverzných mutácií, môžu viesť k preceneniu mutagénnej aktivity.

Bakteriálny test reverzných mutácií nemusí byť vhodný na hodnotenie určitých tried chemikálií, napríklad vysoko baktericídnych zlúčenín (napríklad určitých antibiotík) a tých, o ktorých sa predpokladá (alebo je o nich známe), že špecificky narúšajú replikačný systém buniek cicavcov (napríklad niektoré inhibítory topoizomerázy a niektoré nukleozidové napodobeniny). V takýchto prípadoch sú vhodnejšie testy mutácií u cicavcov.

Hoci mnohé zlúčeniny, ktoré sú v tomto teste pozitívne, sú karcinogénmi u cicavcov, korelácia nie je absolútna. Závisí to od triedy chemikálie a existujú karcinogény, ktoré sa týmto testom nezistia, pretože pôsobia prostredníctvom iných negenotoxických mechanizmov alebo mechanizmov neprítomných v bunkách baktérií.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Suspenzie bakteriálnych buniek sú vystavené testovacej látke v prítomnosti a neprítomnosti exogénneho systému metabolickej aktivácie. Pri metóde použitia misiek sa tieto suspenzie zmiešajú s krycím agarom a umiestnia sa na veľmi malé médium. Pri metóde predinkubácie sa dávkovaná zmes inkubuje a potom zmieša s krycím agarom pred umiestnením na veľmi malé médium. Pri oboch technikách sa po dvoch alebo troch dňoch inkubácie spočítajú reverzné kolónie a porovnajú sa s počtom spontánnych kolónií revertantov na kontrolných miskách.

Boli opísané viaceré postupy uskutočnenia bakteriálneho testu reverzných mutácií. Medzi bežne používané patrí metóda použitia misiek (1) (2) (3) (4), predinkubačná metóda (2) (3) (5) (6) (7) (8), fluktuačná metóda (9) (10) a suspenzná metóda (11). Opísané boli aj modifikácie testovania plynov a pár (12).

▼B

Postupy opísané v tejto metóde sa týkajú najmä metódy použitia misky a predinkubačnej metódy. Obe sú prijateľné pre uskutočňovanie pokusov s metabolickou aktiváciou aj bez nej. Niektoré látky sa dajú efektívnejšie zistiť použitím predinkubačnej metódy. Tieto látky patria do tried chemikálií, ktoré zahŕňajú alifatické nitrozamíny s krátkymi reťazcami, bivalentné kovy, aldehydy, azofarbivá a diazozlúčeniny, pyrolizidínové alkaloidy, alylové zlúčeniny a nitrozlúčeniny (3). Zistilo sa, že niektoré triedy mutagénov sa nie vždy objavia s použitím štandardných postupov, ako napríklad metódou použitia misky alebo predinkubačnou metódou. Tieto mutagény sa považujú za „osobitné prípady“ a na ich zistenie sa dôrazne odporúča použitie alternatívnych postupov. Identifikované boli nasledujúce „osobitné prípady“ (spolu s príkladmi postupov, ktoré by sa dali použiť na ich zistenie): azofarbivá a diazozlúčeniny (3) (5) (6) (13), plyny a prchavé chemikálie (12) (14) (15) (16) a glykozidy (17) (18). Odchýlka od štandardného postupu sa musí vedecky zdôvodniť.

1.5. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.5.1. **Prípravné práce**

1.5.1.1. *Baktérie*

Čerstvé kultúry baktérií sa nechajú vyrásť do neskorého exponenciálneho alebo skorého stacionárneho štádia rastu (približne 10^9 buniek na ml). Kultúry v neskorom stacionárnom štádiu sa nepoužívajú. Je dôležité, aby kultúry použité pri pokuse obsahovali vysoký podiel životaschopných baktérií. Podiel sa dá preukázať buď z minulých kontrolných údajov o rastových krivkách, alebo pri každom pokuse prostredníctvom určenia počtu životaschopných buniek miskovým pokusom.

Odporúčaná inkubačná teplota je 37 °C.

Používa sa najmenej päť kmeňov baktérií. Tieto zahŕňajú štyri kmene *S. typhimurium* (TA 1535; TA 1537 alebo TA 97a alebo TA 97, TA 98 a TA 100), ktoré boli v laboratóriách preukázateľne spoľahlivé a reproduktívne reaktívne. Tieto štyri kmene *S. typhimurium* majú GC bázové páry na primárnom reverznom mieste a je známe, že nemusia zistiť určité oxidujúce mutagény, medzispájacie činitele a hydrazíny. Takéto látky sa dajú zistiť pomocou kmeňov *E. coli* WP2 alebo *S. typhimurium* TA 102 (19), ktoré majú AT bázu na primárnom reverznom mieste. Odporúčanou kombináciou kmeňov je preto:

— *S. typhimurium* TA 1535 a

— *S. typhimurium* TA 1537 alebo TA 97, alebo TA 97a a

— *S. typhimurium* TA 98 a

— *S. typhimurium* TA 100 a

— *E. coli* WP2 uvrA alebo *E. coli* WP2 uvrA (pKM101), alebo *S. typhimurium* TA 102.

Na zistenie spájacích mutagénov je vhodnejšie použiť TA 102 alebo pridať kmeň *E. coli* [napríklad *E. coli* WP2 alebo *E. coli* WP2 (pKMIOl)], ktorý dokonale opravuje DNA.

▼B

Na prípravu kultúr, overovanie bunkových znakov a uskladnenie sa používajú overené postupy. Požiadavka na aminokyselinu pre rast sa preukazuje pre každý prípravok zmrznutej kultúry (histidín pre kmene *S. typhimurium* a tryptofán pre kmene *E. coli*). Podobným spôsobom sa overujú iné fenotypové charakteristiky, menovite ak je potrebná prítomnosť alebo neprítomnosť R-faktorových plazmidov [napríklad odolnosť proti ampicilínu v kmeňoch TA 98, TA 100 a TA 97a alebo TA 97, WP2 uvrA alebo WP2 uvrA (pKM101) a odolnosť proti ampicilínu a tetracyklínu v kmeni TA102]; prítomnosť charakteristických mutácií (t. j. rfa mutácia *S. typhimurium* prostredníctvom citlivosti na kryštálovo fialovú a uvrA mutáciu *E. coli* alebo uvrB mutáciu *S. typhimurium* prostredníctvom citlivosti na ultrafialové svetlo) (2) (3). Kmene by tiež mali dosahovať spontánne počty revertantných kolónií v rámci frekvenčných rozsahov očakávaných podľa historických kontrolných údajov laboratória, najlepšie v rozsahu uvedenom v literatúre.

1.5.1.2. *Médium*

Používa sa vhodné minimálne množstvo agaru (napríklad obsahujúci Vogelovo-Bonnerovo minimálne médium E a glukózu) a krycí agar obsahujúci histidín a biotín alebo tryptofán umožňujúci malý počet delení buniek (1) (2) (9).

1.5.1.3. *Metabolická aktivácia*

Baktérie sa vystavia testovacej látke v prítomnosti i v neprítomnosti vhodného systému metabolickej aktivácie. Najpoužívanejším systémom je postmitochondriálna frakcia podporená kofaktorom (S9), pripravená z pečene hlodavcov ošetrených prípravkami na indukciu enzýmov, ako napríklad Aroclorom 1254 (1) (2) alebo kombináciou fenobarbitonu a betanaftoflavónu (18) (20) (21). Postmitochondriálna frakcia sa zvyčajne používa v koncentrácii v rozsahu od 5 % do 30 % v/v v zmesi S9. Výber a stav systému metabolickej aktivácie môže závisieť od triedy testovanej chemikálie. V niektorých prípadoch je vhodné využiť viac než jednu koncentráciu postmitochondriálnej frakcie. Pre azofarbivá a diazozmesi je vhodnejšie použiť redukčný systém metabolickej aktivácie (6) (13).

1.5.1.4. *Testovacia látka/prípravok*

Pevné testovacie látky sa rozpúšťajú alebo ukladajú v príslušných rozpúšťadlách alebo nosičoch, a ak je to potrebné, rozrieďujú sa pred podávaním baktériám. Kvapalné testovacie látky sa podávajú priamo alebo rozriedené pred podávaním. Používajú sa čerstvé prípravky testovacej látky, pokiaľ údaje o stabilite nepoukazujú na vhodnosť uskladnenia.

Rozpúšťadlo/nosič by nemali chemicky reagovať s testovacou látkou a mali by byť kompatibilné s prežitím buniek a aktivitou S9 (22). Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by mali podporiť údaje označujúce ich kompatibilitu. Odporúča sa zvážiť, ak je to možné, použitie vodného rozpúšťadla/nosiča. Pri testovaní vo vode nestabilných látok by organické rozpúšťadla nemali obsahovať vodu.

▼B

1.5.2. **Podmienky testov**

1.5.2.1. *Testovacie kmene (pozri 1.5.1.1)*

1.5.2.2. *Koncentrácie dávok*

Medzi kritériá, ktoré je potrebné brať do úvahy pri stanovovaní najvyššieho množstva použitej testovacej látky, patrí cytotoxicita a rozpustnosť v konečnej zmesi.

Je užitočné stanoviť toxicitu a nerozpustnosť pri predbežnom pokuse. Cytotoxicita sa dá zistiť redukciou v množstve revertantných kolónií, vyjasnením alebo redukciou pozadia, alebo stupňom prežitia ošetrených kultúr. Cytotoxicita látky sa môže meniť v prítomnosti systémov metabolickej aktivácie. Nerozpustnosť by sa mala určiť ako vyzrážanie v konečnej zmesi za skutočných podmienok testu a musí byť viditeľná voľným okom.

Odporúčaná maximálna testovacia koncentrácia rozpustných necytotoxických látok je 5 mg/miska alebo 5 µl/miska. V prípade necytotoxických látok, ktoré nie sú rozpustné pri 5 mg/miska alebo 5 µl/miska, má byť v konečnej zmesi nerozpustná jedna alebo viac testovaných koncentrácií. Testované látky, ktoré sú cytotoxické už pod 5 mg/miska alebo 5 µl/miska, sa majú testovať až po cytotoxickú koncentráciu. Zrazenina by nemala prekážať vyhodnoteniu.

Malo by sa použiť aspoň päť rôznych analyzovateľných koncentrácií testovanej látky s intervalmi približne pol log (t. j. $\sqrt{10}$) medzi testovanými miestami v počiatočnom experimente. Menšie intervaly môžu byť vhodné vtedy, ak sa skúma vzťah koncentrácia/reakcia. Možno zvážiť testovanie nad koncentráciu 5 mg/miska alebo 5 µl/miska, ak sa vyhodnocujú látky obsahujúce významné množstvá potenciálne mutagénnych nečistôt.

1.5.2.3. *Negatívne a pozitívne kontroly*

Pri každej skúške sa zahrnú súbežne podľa kmeňa špecifické pozitívne a negatívne (rozpúšťadlo alebo nosič) kontrolné kultúry, a to s metabolickou aktiváciou i bez nej. Koncentrácie pri pozitívnych kontrolných kultúrach sa volia tak, aby pri každej skúške vykazovali efektívny výkon.

Pri pokusoch s použitím systému metabolickej aktivácie sa referenčné látky pozitívnej kontrolnej kultúry vyberajú na báze použitého typu bakteriálnych kmeňov.

Nasledujúce látky sú príkladmi látok vhodných pre pozitívne kontrolné kultúry pri pokusoch s metabolickou aktiváciou.

Číslo CAS	Číslo EINECS	Látka
781-43-1	212-308-4	9,10-dimetylantracén
57-97-6	200-359-5	7,12-dimetylbenz[a]anthracén
50-32-8	200-028-5	benzo[a]pyrén
613-13-8	210-330-9	2-aminoantracén

▼B

Číslo CAS	Číslo EINECS	Látka
50-18-0		cyklofosfamid
6055-19-2	200-015-4	cyklofosfamid monohydrát

Nasledujúca látka je vhodná pre pozitívne kontrolné kultúry pri metóde redukčnej metabolickej aktivácie:

Číslo CAS	Číslo EINECS	Látka
573-58-0	209-358-4	Congo Red (červeň Congo)

2-aminoantracén by nemal byť jediným indikátorom efektívnosti zmesi S9. Ak sa používa 2-aminoantracén, každá dávka S9 by tiež mala byť charakterizovaná mutagénom, ktorý vyžaduje metabolickú aktiváciu mikrozomálnymi enzýmami, napríklad benzo[a]pyrén, dimetylbenzantracén.

Nasledujúce látky sú príkladmi pozitívnych kontrolných kultúr podľa kmeňov pre skúšky bez exogénneho systému metabolickej aktivácie:

Číslo CAS	Číslo EINECS	Látka	Kmeň
26628-22-8	247-852-1	azid sodný	TA 1535 a TA 100
607-57-8	210-138-5	2-nitrofluorén	TA 98
90-45-9	201-995-6	9-aminoakridín	TA 1537, TA 97 a TA 97a
17070-45-0	241-129-4	ICR 191	TA 1537, TA 97 a TA 97a
80-15-9	201-254-7	kumén hydroperoxid	TA 102
50-07-7	200-008-6	mitomycín C	WP2 uvrA a TA 102
70-25-7	200-730-1	N-etyl-N-nitro-N-nitrozguanidín	WP2, WP2uvrA a WP2uvrA(pKM101)
56-57-5	200-281-1	4-nitrochinolín-1-oxid	WP2, WP2uvrA a WP2uvrA(pKM101)
3688-53-7		furylfuramid (AF2)	kmene obsahujúce plazmid

Pre pozitívne kontrolné kultúry sa môžu použiť aj ďalšie vhodné referenčné látky. Podľa dostupnosti sa zváži použitie chemikálií príbuzných triede chemikálií pre pozitívnu kontrolnú skupinu.

Použijú sa tiež negatívne kontrolné vzorky pozostávajúce len z rozpúšťadla alebo nosiča, bez testovacej látky a inak ošetrované rovnakým spôsobom ako pokusné skupiny. Používajú sa aj neošetrené kontrolné vzorky, pokiaľ neexistujú historické kontrolné údaje demonštrujúce, že vybrané rozpúšťadlo nespôsobuje žiadne škodlivé alebo mutagénne účinky.

▼B

1.5.3. **Postup**

Pri metóde s použitím misiek (1) (2) (3) (4) bez metabolickej aktivácie sa zvyčajne zmieša 0,05 ml alebo 0,1 ml testovacích roztokov, 0,1 ml čerstvej bakteriálnej kultúry (obsahujúcej približne 10^8 životaschopných buniek) a 0,5 ml sterilného tlmiaceho roztoku s 2,0 ml krycieho agaru. Pri skúške s metabolickou aktiváciou sa zvyčajne zmieša 0,5 ml roztoku metabolickej aktivácie obsahujúceho vhodné množstvo postmitochondriálnej frakcie (v rozmedzí od 5 % do 30 % v/v v roztoku na metabolickú aktiváciu) s krycím agarom (2,0 ml), s baktériami a testovacou látkou/testovacím roztokom. Obsah oboch skúmaviek sa zmieša a vyleje sa na povrch veľmi malej agarovej misky. Krycí agar sa pred inkubáciou nechá vytvrdnúť.

Pri predinkubačnej metóde (2) (3) (5) (6) sa testovacia látka/testovací roztok predinkubuje s testovacím kmeňom (obsahujúcim približne 10^8 životaschopných buniek) a sterilným tlmiacim roztokom alebo systémom metabolickej aktivácie (0,5 ml) zvyčajne na 20 minút alebo viac pri teplote 30 °C – 37 °C pred zmiešaním s krycím agarom a vyliatím na povrch veľmi malej agarovej misky. Zvyčajne sa mieša 0,05 alebo 0,1 ml testovacej látky/testovacieho roztoku, 0,1 ml baktérií a 0,5 ml zmesi S9 alebo sterilného tlmiaceho roztoku s 2,0 ml krycieho agaru. Skúmavky sa počas predinkubácie vetrajú použitím miešadla.

Pri každej úrovni dávok sa kvôli primeranému odhadu variácie používajú tri misky. Použitie dvoch misiek je prijateľné s vedeckým zdôvodnením. Občasná strata misky pokus neznehodnocuje.

Plynné alebo prchavé látky sa testujú vhodnými metódami, ako napríklad vo vzduchotesne uzatvorených nádobách (12) (14) (15) (16).

1.5.4. **Inkubácia**

V danom pokuse sa misky inkubujú pri teplote 37 °C počas 48 – 72 hodín. Po uplynutí inkubačnej doby sa zráta počet revertantných kolónií na misku.

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje sa uvádzajú ako počet revertantných kolónií na misku. Udáva sa tiež počet revertantných kolónií pri negatívnych (kontrola rozpúšťadlom a bez ošetrenia, ak sa použili) a pozitívnych kontrolných kultúrach. Jednotlivé počty na miskách, stredná hodnota revertantných kolónií na misku a štandardná odchýlka sa uvádzajú pre testovaciu látku aj pre pozitívne a negatívne kontrolné kultúry (bez ošetrenia a/alebo s rozpúšťadlom).

Neexistuje požiadavka na potvrdenie jasných pozitívnych reakcií. Nejasné výsledky sa objasňujú ďalším testovaním, najlepšie použitím modifikácie pokusných podmienok. Negatívne výsledky sa musia potvrdiť od prípadu k prípadu. V prípadoch, keď sa potvrdenie negatívnych výsledkov nepovažuje za potrebné, sa poskytne zdôvodnenie. Modifikácia parametrov štúdie na rozšírenie rozsahu hodnotených podmienok sa posudzuje pri následných pokusoch. Parametre štúdie, ktoré sa dajú modifikovať, zahŕňajú rozsahy koncentrácií, metódu aplikácie látky (použitie misky alebo kvapalná predinkubácia) a podmienky metabolickej aktivácie.

▼B

2.2. HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Pre stanovenie pozitívneho výsledku existuje niekoľko kritérií, ako napríklad nárast oproti testovanému rozsahu spojený s koncentráciou a/alebo reprodukovateľný nárast pri jednej alebo viacerých koncentráciách počtu revertantných kolónií na misku najmenej v jednom kmeni so systémom metabolickej aktivácie alebo bez systému metabolickej aktivácie (23). Najprv sa zvažuje biologická relevantnosť výsledkov. Ako pomôcka sa pri hodnotení výsledkov testov používajú štatistické metódy (24). Štatistická významnosť však nie je jediným určujúcim faktorom pozitívnej reakcie.

Testovacia látka, pre ktorú nespĺňajú výsledky vyššie uvedené kritériá, sa pre tento test považuje za nemutagénnu.

Hoci väčšina pokusov poskytne jasne pozitívne alebo negatívne výsledky, v zriedkavých prípadoch súbor údajov vopred vylúči jednoznačné posúdenie aktivity testovacej látky. Výsledky môžu ostať nejasné alebo spochybniteľné bez ohľadu na počet opakovaní pokusu.

Pozitívne výsledky bakteriálneho testu reverzných mutácií naznačujú, že určitá látka vyvoláva bodové mutácie prostredníctvom základných substitúcií alebo konštrukčných posunov genómu *Salmonella typhimurium* a/alebo *Escherichia coli*. Negatívne výsledky naznačujú, že testovacia látka nie je v testovacích podmienkach pre testované druhy mutagénna.

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu zahŕňa nasledujúce informácie:

Rozpúšťadlo/nosič:

— zdôvodnenie výberu nosiča,

— rozpustnosť a stálosť testovacej látky v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa.

Kmene:

— použité kmene,

— počet buniek v kultúre,

— charakteristiky kmeňa.

Podmienky testov:

— množstvo testovacej látky na misku (mg/miska alebo µl/miska) so zdôvodnením voľby dávky a počtu misiek na koncentráciu,

— použité médiá,

— typ a zloženie systému metabolickej aktivácie vrátane kritérií prijateľnosti,

— postupy dávkovania.

Výsledky:

— známky toxicity,

— známky zrážania,

— počty na jednotlivých miskách,

▼B

— stredná hodnota revertantných kolónií na misku a štandardná odchýlka,

— vzťah medzi dávkou a reakciou, ak je to možné,

— štatistické analýzy, ak sa uskutočnili,

— súbežné údaje o negatívnych (rozpúšťadlo/nosič) a pozitívnych kontrolných kultúrach s rozsahmi, strednými hodnotami a štandardnými odchýlkami,

— historické údaje o negatívnych (rozpúšťadlo/nosič) a pozitívnych kontrolných kultúrach s rozsahmi, strednými hodnotami a štandardnými odchýlkami.

Rozbor výsledkov.

Závery.

4. **ODKAZY**

(1) Ames, B. N., McCann, J. a Yamasaki, E. (1975) Methods of Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/ Mammalian Microsome Mutagenicity Test, Mutation Res., 31, s. 347 – 364.

(2) Maron, D. M. a Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, Mutation Res., 113, s. 173 – 215.

(3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C, Nohmi, T., Venitt, S. a Zeiger, E. (1994) Recommendations for the Perfomance of Bacterial Mutation Assays, Mutation Res., 312, s. 217 – 233.

(4) Kier, L. D., Brusick, D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Príval, M., Rao, T. K. a Ray, V. (1986), The Salmonella typhimurium/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, Mutation Res., 168, s. 69 – 240.

(5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y. Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. a Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, Cancer letters 1, s. 91 – 96.

(6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. a Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Test, in: Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens, ed. Norpoth, K. H. a Garner, R C, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, s. 273 – 285.

(7) Gatehouse, D. G, Rowland, I. R, Wilcox, P., Callender, R D. a Foster, R (1980), Bacterial Mutation Assays, in: Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part 1 Revised, ed. D. J. Kirkland, Cmabridge University Press, s. 13 – 61.

(8) Aeschacher, H. U, Wolleb, U. a Porchet, L. (1987), Liquid Mutagenicity Test for Foods, J. Food Safety, 8, s. 167 – 177.

(9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. a Bridges, B. A. (1976), Use of a Simplified Fluctuation Test to Detect Low Levels of Mutagens, Mutation Res., 38, s. 33 – 42.

(10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. a Bridges, J. W. (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: Handbook of Mutagenicity Test Procedures, 2. vydanie, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. a Ramel, C, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, s. 141 – 161.

▼B

(11) Thomson, E. D. a Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*, Environmental Mutagenesis, 3, s. 453 – 465.

(12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. a Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, Mutation Res., 307, s. 335 – 344.

(13) Príval, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D a Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified Salmonella Assay, Mutation Res., 136, s. 33 – 47.

(14) Zeiger, E., Anderson, B. E., Haworth, S., Lawlor, T. a Mortelmans, K. (1992), Salmonella Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals (Testy mutagénnosti samonelly, výsledky testovania 311 chemikálií), Environ. Mol. Mutagen., 19, s. 2 – 141.

(15) Simmon, V., Kauhanen, K. a Tardiff, R. G (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in: Progress in Genetic Toxicology, D. Scott, B. Bridges a F. Soebels (eds), Elsevier, Amsterdam, s. 249 – 258.

(16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. a Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/Salmonella Assay, Environmental Mutagenesis, 9, s. 421 – 441.

(17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M. a Sugimura, T. (1979) Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cyasin and Synthetic Metylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*, Cancer Res., 39, s. 3780 – 3782.

(18) Tamura, G, Gold, C, Ferro-Luzzi, A. a Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, s. 4961 – 4965.

(19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J., a Gatehouse, D. G (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia Coli* WP2 Tester Strains, Mutagenesis, 5, s. 285 – 291.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. a Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyl as an Inducer of Metabolic Activation Systems, in: In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis testing, de Serres a kol. (eds), Elsevier, North Holland, s. 85 – 88.

(21) Elliot, B. M., Combes, R D. Elcombe, C. R, Gatehouse, D. G, Gibson, G. G, Mackay, J. M. a Wolf, R. C. (1992), Alternative to Aroclor 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays, Mutagenesis, 7, s. 175 – 177.

(22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. a Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the Salmonella/-Microsome Test, Mutation Res., 88, s. 343 – 350.

(23) Claxton, L. D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K, Nestmann, E. a Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium/Mammalian* Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, Mutation Res., 189, s. 83 – 91.

▼B

(24) Mahon, G A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchel, I., Robinson, W. D. a Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Report, Part II, Statistical Evaluation of Mutagenicity test Data, ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, Cambridge, s. 28 – 65.

▼B

B.15. **TESTOVANIE MUTAGÉNNOSTI A SKRÍNING KARCINOGÉNNOSTI – SKÚŠKA NA GÉNOVÚ MUTÁCIU U *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 agensmi sa používa množstvo haploidných a diploidných kmeňov kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* buď s metabolickou aktiváciou, alebo bez nej.

Môže sa použiť 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 používa 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 s 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* sa prevažne používa kmeň D_7, ktorý je homozygotný v *ilv 1-92.*

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

Príprava

Roztoky testovaných chemikálií a kontroly by sa mali pripravovať tesne pred testovaním s použitím vhodných rozpúšťadiel. V prípade organických zlúčenín, ktoré nie sú rozpustné vo vode, malo by sa použiť organické rozpúšťadlo ako etanol, acetón alebo dimetylsulfoxid (DMSO), najviac 2 % roztok v/v. Výsledná koncentrácia rozpúšťadla by nemala výrazne ovplyvňovať životaschopnosť buniek a rastové parametre.

▼B

Metabolická aktivácia

Bunky by mali byť ovplyvnené testovanou látkou bez prítomnosti a s prítomnosťou vhodného exogénneho metabolického aktivačného systému.

Najbežnejšie používaný systém je postmitochondriálna frakcia z pečene hlodavcov doplnená kofaktormi, vopred ovplyvnená látkami indukujúcimi enzýmy. Na metabolickú aktiváciu môže byť vhodné použitie aj iných druhov, tkanív, postmitochondriálnych frakcií alebo iných postupov.

Podmienky testovania

Testovacie kmene

Pre testy génových mutácií je najpoužívanejší haploidný kmeň XV 185-14C a diploidný kmeň D_7. 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 sa mali testovať až do hranice ich rozpustnosti s 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 °C a 30 °C v tme.

Frekvencia spontánnych mutácií

Mali by sa použiť monokultúry s frekvenciou spontánnych mutácií v prijateľnom rozsahu.

▼B

Počet opakovaní

Pri testovaní vzniku prototrofov génovou mutáciou a pre stanovenie prežívania buniek by sa mali použiť 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 s použitím stacionárnych alebo rastúcich buniek. Začiatočné experimenty by sa mali robiť na rastúcich bunkách: bunky s koncentráciou $1 – 5 \times 10^7$/ml sú ovplyvnené testovanou chemikáliou maximálne 18 hodín pri 28 °C 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 sa platne vyhodnotia 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 sa mali prezentovať v tabuľke a udávať počet kolónií, počet mutantov, prežívania a frekvenciu mutantov. Všetky výsledky by sa mali potvrdiť v nezávislom experimente. Výsledky by sa mali vyhodnotiť 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 inkubačnú teplotu, metabolický aktivačný systém,

— podmienky vystavenia: použité koncentrácie, metódy a čas vystavenia a teplotu 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.

▼B

B.16. **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 vnútri génov. Prvý dej sa nazýva mitotický crossing-over a vytvára recipročné produkty, zatiaľ čo druhý dej je najčastejšie nereciprocný 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 kmene 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_5 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.

▼B

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.

▼B

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 $1 - 5 \times 10^7$/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.

▼B

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

▼B

B.17. MUTAGÉNNOSŤ – *IN VITRO* TEST MUTÁCIÍ GÉNOV BUNIEK CICAVCOV

1. METODA

Táto metóda je obdobou OECD TG 476, *in vitro* test mutácií génov buniek cicavcov (1997).

1.1. ÚVOD

In vitro test mutácií génov buniek cicavcov sa používa na zistenie mutácií vyvolaných chemickými látkami. Vhodné bunkové línie zahŕňajú L5178Y lymfómové *(lymphoma)* bunky myší, CHO, CHO-AS52 a V79 línie buniek čínskych morčiat a TK6 lymfoblastoidné bunky ľudí (1). V týchto bunkových líniách najbežnejšie používané genetické merania merajú mutácie na timidínovej kináze (TK) a hypoxantino-guanínovej fosforibosilovej transferáze (HPRT) a transgén xantínovo-guanínovej fosforibozylovej transferáze (XPRT). Testy mutácií TK, HPRT a XPRT zisťujú rôzne spektrum genetických udalostí. Autozomálna poloha TK a XPRT môže umožňovať zistenie genetických udalostí (napríklad: veľké vymazania), nezistené v mieste HPRT na X chromozómoch (2)(3)(4)(5)(6).

V *in vitro* teste mutácií génov buniek cicavcov sa používajú kultúry ujatých bunkových línií alebo bunkových kmeňov. Použité bunky sa vyberajú na základe rastovej schopnosti kultúry a stability frekvencie spontánnych mutácií.

Testy vykonávané *in vitro* vo všeobecnosti vyžadujú použitie exogénneho zdroja metabolickej aktivácie. Tento systém metabolickej aktivácie nemôže úplne napodobniť podmienky *in vivo* cicavcov. Je potrebná opatrnosť pri vyhýbaní sa podmienkam, ktoré by viedli k pozitívnym výsledkom, ktoré neodrážajú vnútornú mutagénnosť. Pozitívne výsledky, ktoré neodrážajú vnútornú mutagénnosť, môžu pochádzať zo zmien pH, osmolality alebo vysokých hladín cytotoxicity (7).

Tento test sa používa na zistenie možných mutagénov a karcinogénov u cicavcov. Mnohé zmesi, ktoré sú v tomto teste pozitívne, sú pre cicavcov karcinogénmi, avšak neexistuje dokonalá korelácia medzi týmto testom a karcinogénnosťou. Korelácia závisí od triedy chemikálie a je stále viac dôkazov, že existujú karcinogény, ktoré tento test neodhalí, pretože pravdepodobne účinkujú prostredníctvom odlišných negenotoxických mechanizmov alebo mechanizmov neprítomných v bunkách baktérií (6).

Pozri tiež všeobecný úvod, časť B.

1.2. DEFINÍCIE

Predná mutácia: génová mutácia z rodičovského typu mutantných foriem, ktorá umožňuje zmenu alebo stratu enzymatickej aktivity funkcie kódovaného proteínu.

Mutagény substituujúce bázové páry: látky, ktoré spôsobujú substitúciu jedného alebo viacerých bázových párov v DNA.

Konštrukčné mutagény: sú činiteľmi, ktoré v molekule DNA spôsobujú pridanie alebo vymazanie jedného alebo viacerých základných párov.

▼B

Doba fenotypického prejavu: obdobie, počas ktorého sú nezmenené génové produkty vyčerpané z novomutovaných buniek.

Mutačná frekvencia: pozorovaný počet mutantných buniek delený počtom životaschopných buniek.

Relatívny celkový rast: zvýšenie počtu buniek v čase v porovnaní s kontrolnou populáciou buniek; vypočítava sa ako výsledok rastu suspenzie v pomere k času negatívnej kontrolnej kultúry krát klonovacia efektívnosť v pomere k negatívnej kontrolnej kultúre.

Relatívny suspenzný rast: zvýšenie počtu buniek v porovnaní s časom prejavu v pomere k negatívnej kontrolnej kultúre.

Životaschopnosť: klonovacia efektívnosť ošetrených buniek v čase umiestnenia na misky v selektívnych podmienkach po čase prejavu.

Prežitie: klonovacia efektívnosť ošetrených buniek pri umiestnení na misky na konci doby podávania; prežitie sa obyčajne vyjadruje v pomere k prežitiu populácie kontrolných buniek.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Bunky s nedostatkom tymidínovej kinázy (TK) z dôvodu mutácie $TK^{+/-}$ -> $TK^{-/-}$ sú odolné voči cytotoxickým účinkom pyrimidínovej obdoby trifluoroťnymidínu (TFT). Bunky s dostatkom tymidínovej kinázy sú citlivé na TFT, ktorý spôsobuje inhibíciu bunkového metabolizmu a zastavuje ďalšie delenie buniek. Tieto mutantné bunky sú schopné rozširovať sa za prítomnosti TFT, zatiaľ čo normálne bunky, ktoré obsahujú tymidínovú kinázu, nie sú. Podobne aj bunky s nedostatkom HPRT alebo XPRT sa vyberajú podľa odolnosti voči 6-thioguanínu (TG) alebo 8-azaguanínu (AG). Vlastnosti testovacej látky je potrebné zvážiť v prípadoch, keď sa bázová obdoba alebo zlúčenina príbuzná so selektívnym činidlom testujú v akýchkoľvek testoch mutácií génov buniek cicavcov. Potrebné je napríklad preskúmať akúkoľvek predpokladanú selektívnu toxicitu testovacej látky pre mutantné a nemutantné bunky. Pri testovaní chemikálií štrukturálne príbuzných so selektívnym činidlom je preto nutné overiť výkon selektívneho systému/činidla (8).

Bunky v suspenzii alebo jednovrstvovej kultúre sa vystavia testovacej látke s metabolickou aktiváciou i bez metabolickej aktivácie na vhodnú dobu a subkultivujú sa na stanovenie cytotoxicity a na umožnenie fenotypického prejavu pred mutantnou selekciou (9) (10) (11) (12) (13). Cytotoxicita sa zvyčajne stanovuje meraním relatívnej klonovacej efektívnosti (prežitie) alebo relatívneho celkového rastu kultúr po dobe podávania. Ošetrené kultúry sa vhodnú dobu, charakteristickú pre každý vybraný lokus a typ buniek, udržiavajú v rastovom médiu, čo umožní takmer optimálny fenotypický prejav indukovaných mutácií. Mutačná frekvencia sa stanovuje zasadením známeho počtu buniek do média obsahujúceho selektívne činidlo na zistenie mutantných buniek a do média bez selektívneho činidla na stanovenie klonovacej efektívnosti (životaschopnosti). Po vhodnej inkubačnej dobe sa kolónie zrátajú. Mutačná frekvencia sa odvodzuje od počtu mutantných kolónií v selektívnom médiu a počtu kolónií v neselektívnom médiu.

▼B

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Prípravné práce**

1.4.1.1. *Bunky*

Pre použitie v tomto teste sú dostupné rôzne bunkové typy, vrátane subklonov buniek L5171Y, CHO, CHO-AS52, V79 alebo TK6. Typy buniek použité v tomto teste majú preukázanú citlivosť na chemické mutagény, vysokú klonovaciu efektívnosť a stabilnú frekvenciu spontánnych mutácií. Bunky sa kontrolujú na kontamináciu mykoplazmou a pri jej zistení sa nepoužívajú.

Test by sa mal formulovať tak, aby mal vopred určenú citlivosť a silu. Počet použitých buniek, kultúr a koncentrácií testovacej látky odráža tieto definované parametre (14). Minimálny počet životaschopných buniek, ktoré prežijú podávanie a ktoré sa použijú v každom štádiu testu, je založený na frekvencii spontánnych mutácií. Všeobecným pravidlom je použiť počet buniek, ktorý je najmenej 10-krát taký veľký, ako prevrátená hodnota frekvencie spontánnych mutácií. Odporúča sa však použiť najmenej 10^6 buniek. Na znázornenie konzistentného výkonu testu by mali byť dostupné historické údaje o použitom systéme buniek

1.4.1.2. *Médiá a podmienky kultúr*

Používajú sa príslušné médiá a inkubačné podmienky (nádoby, koncentrácia CO_2, teplota a vlhkosť). Médiá sa vyberajú podľa selektívnych systémov a typu buniek použitých počas testu. Osobitne dôležité je zvoliť podmienky kultúr tak, aby bol zabezpečený optimálny rast buniek počas obdobia prejavu a schopnosť formovania kolónií mutantných aj nemutantných buniek.

1.4.1.3. *Príprava kultúr*

Bunky sa odoberajú z kultúr vysadených v médiu a inkubovaných pri teplote 37 °C. Pred použitím v tomto teste sa kultúry podľa potreby prečistia od existujúcich mutantných buniek.

1.4.1.4. *Metabolická aktivácia*

Bunky sa vystavia testovacej látke za prítomnosti aj za neprítomnosti vhodného systému metabolickej aktivácie. Najpoužívanejším systémom je postmitochondriálna frakcia podporená kofaktorom (S9) pripravená z pečene hlodavcov a ošetrená prípravkami na indukciu enzýmov ako napríklad Aroclorom 1254 (15) (16) (17) (18) alebo kombinácia fenobarbitonu a beta-naftoflavónu(19)(20).

Postmitochondriálna frakcia sa zvyčajne používa v koncentráciách v rozpätí od 1 – 10 % v/v v konečnom testovacom médiu. Výber a stav systému metabolickej aktivácie závisí od triedy testovanej chemikálie. V niektorých prípadoch je vhodné využiť viac než jednu koncentráciu postmitochondriálnej frakcie.

▼B

Množstvo situácií, vrátane vytvorenia geneticky vypestovaných bunkových línií vyjadrujúcich špecifické aktivačné enzýmy, môže poskytnúť potenciál pre endogénnu aktiváciu. Výber použitých bunkových línií sa vedecky zdôvodňuje (napríklad: relevantnosťou cytochrómového P450 izoenzýmu pre metabolizmus testovacej látky).

1.4.1.5. *Príprava testovacej látky*

Pevné testovacie látky sa rozpúšťajú alebo ukladajú v príslušných rozpúšťadlách alebo nosičoch a rozrieďujú, ak je to potrebné pred ošetrením buniek. Kvapalné testovacie látky môžu byť pridané priamo do testovacích systémov a/alebo rozriedené pred ošetrením. Používajú sa čerstvé prípravky testovacej látky, pokiaľ údaje o stabilite nepoukazujú na vhodnosť uskladnenia.

1.4.2. **Podmienky testov**

1.4.2.1. *Rozpúšťadlo/nosič*

Rozpúšťadlo/nosič by nemali chemicky reagovať s testovacou látkou a mali by byť kompatibilné s prežitím buniek a aktivitou S9. Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by malo byť podporené údajmi označujúcimi ich kompatibilitu. Odporúča sa zvážiť, pokiaľ je to možné, použitie vodného rozpúšťadla/nosiča. Pri testovaní látok vo vode nestálych by organické rozpúšťadlá nemali obsahovať vodu. Vodu je možné odstrániť pridaním molekulárneho sitka.

1.4.2.2. *Koncentrácie*

Medzi kritériá, ktoré treba zvážiť pri určovaní najvyššej koncentrácie, patria cytotoxicita, rozpustnosť v testovacom systéme a zmeny pH alebo osmolality.

Cytotoxicita sa stanovuje s metabolickou aktiváciou a bez metabolickej aktivácie pri hlavnom pokuse s použitím príslušného označenia integrity a rastu buniek, ako napríklad relatívnej klonovacej efektívnosti (prežitie) alebo relatívneho celkového rastu. Užitočné je stanovenie cytotoxicity a rozpustnosti v predbežnom pokuse.

Používať by sa mali najmenej štyri analyzovateľné koncentrácie. Pri výskyte cytotoxicity tieto koncentrácie pokrývajú rozsah od maximálnej po malú alebo žiadnu toxicitu; toto zvyčajne znamená, že koncentrácie sú oddelené nie viac ako jedným koeficientom medzi 2 a √10. Ak je najvyššia koncentrácia založená na cytotoxicite, jej výsledkom je približne 10 – 20 % (avšak nie menej ako 10 %) relatívneho prežitia (relatívna klonovacia efektívnosť) alebo relatívneho celkového rastu. Pre relatívne necytotoxické látky sú maximálne testovacie koncentrácie 5 mg/ml, 5 µl/ml alebo 1,01 M, podľa toho, ktorá je najnižšia.

▼B

Relatívne nerozpustné látky sa testujú po limit rozpustnosti v podmienkach kultúry. V konečnom médiu, ktorému sú bunky vystavené, sa stanovujú dôkazy nerozpustnosti. Užitočné je odhadnúť rozpustnosť na začiatku a na konci podávania, keďže rozpustnosť sa môže zmeniť počas priebehu vystavenia v testovacom systéme kvôli prítomnosti buniek, séra S9 atď. Nerozpustnosť sa zisťuje voľným okom. Zrazenina hodnoteniu neprekáža.

1.4.2.3. *Kontrolné kultúry*

Pri každom pokuse sa vytvoria pozitívne a negatívne (rozpúšťadla alebo nosiča) kontrolné kultúry s metabolickou aktiváciou i bez metabolickej aktivácie. Pri použití metabolickej aktivácie by pozitívna kontrolná kultúra mala byť tá, pri ktorej sa na vznik mutagénnej reakcie vyžaduje aktivácia.

Príklady látok pre pozitívnu kontrolnú kultúru:

Stav metabolickej aktivácie	Miesto	Látka	Číslo CAS	Číslo EINECS
neprítomnosťexogénnej metabolickej aktivácie	HPRT	etylmetánsulfonát	62-50-0	200-536-7
		etylnitrozmočovina	759-73-9	212-072-2
	TK (malé a veľké kolónie)	metylmetánsulfonát	66-27-3	200-625-0
	XPRT	etylmetánsulfonát	62-50-0	200-536-7
		etylnitrozmočovina	759-73-9	212-072-2
prítomnosť exogénnej metabolickej aktivácie	HPRT	3 -metylcholanthrén	56-49-5	200-276-4
		N-nitrozodimetylamín	62-75-9	200-549-8
		7,12-dimetylbenzanthracén	57-97-6	200-359-5
	TK (malé a veľké kolónie)	cyklofosfamid	50-18-0	200-015-4
		monohydrát cyklofosfamidu	6055-19-2	
		benzo[a]pyrén	50-32-8	200-028-5
		3-mety lcho lanthén	56-49-5	200-276-5
	XPRT	N-nitrozodimetylamín (pre vysoké dávky S9)	62-75-9	200-549-8
		benzo[a]pyrén	50-32-8	200-028-5

Na pozitívnu kontrolnú kultúru sa môžu použiť aj iné vhodné látky, napríklad: ak laboratórium má historickú databázu o 5-bromo 2'-deoxyuridíne (CAS č. 59-14-3, Einecs č. 200-415-9), použije sa aj táto referenčná látka. Podľa dostupnosti sa tiež zváži použitie chemikálií pre pozitívnu kontrolnú skupinu v triede príbuzných chemikálií.

▼B

Použijú sa negatívne kontrolné kultúry, pozostávajúce iba zo samotného rozpúšťadla alebo nosiča v médiu, a ošetrené rovnakým spôsobom ako ošetrované kultúry. Použijú sa aj neošetrené kontrolné kultúry, pokiaľ neexistujú historické kontrolné údaje demonštrujúce, že vybrané rozpúšťadlo nespôsobuje žiadne škodlivé alebo mutagénne efekty.

1.4.3. **Postup**

1.4.3.1. *Podávanie testovacej látky*

Rozširujúce sa bunky sa exponujú testovacej látke s metabolickou aktiváciou i bez metabolickej aktivácie. Exponovanie trvá vhodnú dobu (efektívnych je zvyčajne 3-6 hodín). Doba expozície sa môže predĺžiť počas jedného alebo viacerých bunkových cyklov.

Pri každej testovanej koncentrácii sa môžu použiť duplicitné alebo jednotlivé ošetrené kultúry. Pri použití jednotlivých kultúr sa počet koncentrácií zvýši na zabezpečenie primeraného počtu kultúr na analýzu (napríklad: minimálne 8 analyzovateľných koncentrácií). Používajú sa duplicitné negatívne (s rozpúšťadlom) kontrolné kultúry.

Plynné alebo prchavé látky sa testujú príslušnými metódami, ako napríklad vo vzduchotesne uzavretých nádobách (21),(22).

1.4.3.2. *Meranie prežitia, životaschopnosti a mutačnej frekvencie*

Na konci expozičného obdobia sa bunky očistia a kultivujú na stanovenie prežitia a na umožnenie prejavu mutantného fenotypu. Meranie cytotoxicity stanovením relatívnej klonovacej frekvencie (prežitie) alebo relatívneho celkového rastu kultúr sa zvyčajne uskutoční po dobe podávania.

Každé miesto má definovanú požiadavku na minimálnu dobu na umožnenie takmer optimálneho fenotypického prejavu novoindukovaných mutantov (HPRT a XPRT vyžadujú najmenej 6 – 8 dní a TK najmenej 2 dni). Bunky rastú v médiu so selektívnym činiteľom aj bez selektívneho činiteľa/činiteľov na stanovenie počtu mutantov a klonovacej efektívnosti. Meranie životaschopnosti (používa sa na výpočet mutačnej frekvencie) sa uskutočňuje na konci obdobia prejavu umiestnením na misky s neselektívnym médiom.

Ak je testovacia látka v L5178Y $TK^{+/-}$ teste pozitívna, meranie veľkosti kolónie sa uskutoční minimálne na jednej testovanej kultúre (najvyššia pozitívna koncentrácia) a na negatívnych a pozitívnych kontrolných kultúrach. Ak je testovacia látka v L5178Y $TK^{+/-}$ teste negatívna, meranie veľkosti kolónie sa uskutoční na negatívnych a pozitívnych kontrolných kultúrach. Meranie kolónií sa tiež môže uskutočniť pri štúdiách používajúcich $TK6TK^{+/-}$.

▼B

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje zahŕňajú stanovenie cytotoxicity a životaschopnosti, počet kolónií a mutačné frekvencie pre ošetrované a kontrolné kultúry. V prípade pozitívnej reakcie v teste L5178TK$^{+/-}$ sa kolónie hodnotia použitím kritérií malých a veľkých kolónií na najmenej jednej koncentrácii testovacej látky (najvyššia pozitívna koncentrácia) a na negatívnych a pozitívnych kontrolných kultúrach. Podrobne bola preskúmaná molekulárna a cytogenetická povaha veľkých a malých kolónií mutácií (23), (24). V teste TK$^{+/-}$ sa kolónie hodnotia použitím kritérií pre kolónie s normálnym rastom (veľké) a pomalým rastom (malé) (25). Mutantné bunky, ktoré utrpeli najväčšie genetické poškodenie, majú predĺžené časy delenia, a preto tvoria malé kolónie. Toto poškodenie je zvyčajne v rozsahu od straty celého génu po karyotypicky viditeľné chromozómové odchýlky. Vznik mutovaných malých kolónií sa spája s chemikáliami, ktoré indukujú veľké chromozómové odchýlky (26). Menej vážne ovplyvnené mutantné bunky rastú rýchlosťou podobnou ako rodičovské bunky a tvoria veľké kolónie.

Uvádza sa prežitie (relatívna klonovacia efektívnosť) alebo relatívny celkový rast. Mutačná frekvencia sa vyjadruje ako počet mutantných buniek na počet prežitých buniek.

Uvádzajú sa údaje o jednotlivých kultúrach. Všetky údaje sa tiež sumarizujú v tabuľkovej forme.

Neexistuje požiadavka na potvrdenie jasnej pozitívnej reakcie. Nejasné výsledky sa objasňujú ďalším testovaním najmä využitím modifikácie pokusných podmienok. Negatívne výsledky sa musia potvrdiť z prípadu na prípad. V prípadoch, keď sa potvrdenie negatívnych výsledkov nepovažuje za potrebné, poskytne sa zdôvodnenie. Modifikácia parametrov štúdie na rozšírenie rozsahu hodnotených podmienok sa posudzuje pri následných pokusoch, a to buď pri nejasných alebo negatívnych výsledkoch. Parametre štúdie, ktoré sa môžu modifikovať, zahŕňajú koncentráciu a podmienky metabolickej aktivácie.

2.2. HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Pre stanovenie pozitívneho výsledku existuje niekoľko kritérií, ako napríklad nárast spojený s koncentráciou alebo reprodukovateľný nárast mutačnej frekvencie. Najprv sa zvažuje biologická relevantnosť výsledkov. Ako pomôcka sa pri hodnotení výsledkov testov používajú štatistické metódy. Štatistický význam nie je jediným určujúcim faktorom pre pozitívnu reakciu.

Testovacia látka, pre ktorú výsledky nespĺňajú vyššie uvedené kritériá, sa v tomto systéme považuje za nemutagénnu.

▼B

Hoci väčšina pokusov poskytne jednoznačne pozitívne alebo negatívne výsledky, v zriedkavých prípadoch súbor údajov vopred vylúči jednoznačné posúdenie aktivity testovacej látky. Výsledky môžu ostať nejasné alebo spochybniteľné bez ohľadu na počet opakovaní pokusu. Pozitívne výsledky *in vitro* testu mutácií génov buniek cicavcov naznačujú, že testovacia látka vyvoláva génové mutácie v použitých kultúrach buniek cicavcov. Najdôležitejšou je reprodukovateľná pozitívna reakcia na koncentráciu. Negatívne výsledky naznačujú, že v testovacích podmienkach testovacia látka neindukuje génové mutácie v použitých kultúrach buniek cicavcov.

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu zahŕňa nasledujúce informácie:

Rozpúšťadlo/nosič:

— zdôvodnenie voľby nosiča,

— rozpustnosť a stabilita testovacej látky v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa.

Bunky:

— typ a zdroj buniek,

— počet bunkových kultúr,

— počet bunkových prechodov, ak je to vhodné,

— metódy udržiavania bunkovej kultúry, ak je to vhodné,

— neprítomnosť mykoplazmy.

Podmienky testov:

— zdôvodnenie výberu koncentrácií a počtu kultúr vrátane napríklad údajov o cytotoxicite a obmedzeniach rozpustnosti, ak sú dostupné,

— skladba média, koncentrácia CO_2,

— koncentrácia testovacej látky,

— objem nosiča a pridanej testovacej látky,

— inkubačná teplota,

— inkubačná doba,

— trvanie podávania,

— hustota buniek pri vysádzaní,

— typ a zloženie systému metabolickej aktivácie vrátane kritérií prijateľnosti,

— pozitívne a negatívne kontrolné kultúry,

▼B

— dĺžka obdobia prejavu (vrátane počtu vysadených buniek, subkultúr a harmonogramov kŕmenia, ak je to vhodné),

— selektívne činitele,

— kritériá na hodnotenie pokusov ako pozitívne, negatívne alebo nejasné,

— metódy použité na stanovenie počtu životaschopných a mutantných buniek,

— definícia kolónií, hodnotí sa veľkosť a typ (vrátane kritérií na „malé“ a „veľké“, ak je to vhodné).

Výsledky:

— známky toxicity,

— známky zrážania,

— údaje o pH a osmolalite počas vystavenia testovacej látke, ak sú stanovené,

— veľkosť kolónie, ak sa hodnotí, prinajmenšom pre negatívne a pozitívne kontrolné kultúry,

— primeranosť laboratória na zistenie malých mutantných kolónií so systémom L5178TK$^{+/-}$, ak je to vhodné,

— vzťah medzi dávkou a reakciou, ak je možné ho určiť,

— štatistické analýzy, ak existujú,

— súčasné údaje o negatívnej (rozpúšťadlo/nosič) a pozitívnej kultúre,

— historické údaje o negatívnej (rozpúšťadlo/nosič) a pozitívnej kultúre, s rozsahmi, modusmi a štandardnými odchýlkami,

— mutačná frekvencia.

Rozbor výsledkov

Závery

4. **LITERATÚRA**

(1) Moore, M.M., DeMarini, D.M., DeSerres, FJ. and Tindall, K.R. (Eds.) (1987). Banbury Report 28: Mammalian Cell Mutagenesis, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

(2) Chu, E.H.Y. and Mailing, H.V. (1968). Mammalian Cell Genetics. II. Chemical Induction of Specific Locus Mutations in Chinese Hamster Cells *In Vitro,* Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 61, 1306 – 1312.

(3) Liber, H.L. and Thilly, W.G (1982). Mutation Assay at the Thymidine Kinase Locus in Diploid Human Lymphoblasts. Mutation Res., 94, 467 – 485.

(4) Moore, M.M., Harington – Brock, K, Doerr, C.L. and Dearfield, K.L. (1989). Differential Mutant Quantitation at the Mouse Lymphoma TK and CHO HGPRT Loci. Mutagenesis, 4, 394 – 403.

▼B

(5) Aaron, C.S. and Stankowski, Jr.L.F. (1989). Comparison of the AS52/XPRT and the CHO/HPRT Assays: Evaluation of Six Drug Candidates. Mutation Res., 223, 121 – 128.

(6) Aaron, C.S., Bolcsfoldi, G, Glatt, H.R, Moore, M., Nishi, Y., Stankowski, Jr.L.F., Theiss, J. and Thompson, E. (1994). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Working Group Report. Report of the International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Mutation Res., 312. 235 – 239.

(7) Scott, D., Galloway, S.M., Marshall, RR, Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B.C. (1991). Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9. Mutation Res., 257, 147 – 204.

(8) Clive, D., McCuen, R, Spector, J.F.S., Piper, C. and Mavournin, K.H. (1983). Specific Gene Mutations in L5178Y Cells in Culture. A Report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene – Tox Program. Mutation Res., 115. 225 – 251.

(9) Li, A.P., Gupta, R.S., Heflich, RH. and Wasson, IS. (1988). A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/-Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene – Tox Program. Mutation Res., 196, 17 – 36.

(10) Li, A.P., Carver, J.H, Choy, W.N, Hsie, A.W., Gupta, R.S., Loveday, K.S., O'Neill, LP., Riddle, J.C., Stankowski, L.F. Jr. and Yang, L.L. (1987). A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine – Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay. Mutation Res., 189, 135 – 141.

(11) Liber, H.L., Yandell, D.W and Little, J.B. (1989). A Comparison of Mutation Induction at the TK and HPRT Loci in Human Lymphoblastoid Cells: Quantitative Differences are Due to an Additional Class of Mutations at the Autosomal TK Locus. Mutation Res., 216, 9 – 17.

(12) Stankowski, L.F. Jr., Tindall, K.R and Hsie, A.W. (1986). Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate – and ICR 191 – Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanosulphonate – and ICR 191 – Induced Mutation in AS52 Cells. Mutation Res., 160, 133 – 147.

(13) Turner, N.T., Batson, A.G and Clive, D. (1984). Procedures for the L5178Y/$TK^{+/-}$ – $TK^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cell Mutagenicity Assay. In: Kilbey, B.J. et al (eds.) Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Elsevier Science Publishers, New York, pp. 239 – 268.

(14) Arlett, C.F., Smith, D.M., Clarke, G.M., Green, M.H.L., Cole, J., McGregor, D.B. and Asquith, J.C. (1989). Mammalian Cell Gene Mutation Assays Based upon Colony Formation. In: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D.J., Ed., Cambridge University Press, pp. 66 – 101.

(15) Abbondandolo, A., Bonatti, S., Corti, G, Fiorio, R., Loprieno, N. and Mazzaccaro, A. (1977). Induction of 6 – Thioguanine – Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse – Liver Microsome – Activated Dimethylnitrosamine. Mutation Res., 46, 365 – 373.

(16) Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E. (1975). Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/-Mammalian – Microsome Mutagenicity Test. Mutation Res., 31, 347 – 364.

▼B

(17) Clive, D., Johnson, K.O., Spector, J.F.S., Batson, A.G. and Brown M.M.M. (1979). Validation and Characterization of the L5178Y/TK+/– Mouse Lymphoma Mutagen Assay System. Mutat. Res., 59, 61 – 108.

(18) Maron, D.M. and Ames, B.N. (1983). Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res., 113, 173 – 215.

(19) Elliott, B.M., Combes, R.D., Elcombe, C.R, Gatehouse, D.G, Gibson, G.G., Mackay, J.M. and Wolf, R.C. (1992). Alternatives to Aroclor 1254 – Induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays. Mutagenesis, 7, 175 – 177.

(20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976). A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems. In: *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, de Serres, F.J., Fouts, J.R., Bend, J.R. and Philpot, RM. (eds), Elsevier, North – Holland, pp. 85 – 88.

(21) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooey, K.T. (1982). CHO/-HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids. In: Tice, R.R., Costa, D.L., Schaich, K.M. (eds). Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, pp. 91 – 103.

(22) Zamora, P.O., Benson, J.M., Li, A.P. and Brooks, A.L. (1983). Evaluation of an Exposure System Using Cells Grown on Collagen Gels for Detecting Highly Volatile Mutagens in the CHO/HGPRT Mutation Assay. Environmental Mutagenesis, 5, 795 – 801.

(23) Applegate, M.L., Moore, M.M., Broder, C.B., Burrell, A. and Hozier, J.C. (1990). Molecular Dissection of Mutations at the Heterozygous Thymidine Kinase Locus in Mouse Lymphoma Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 51 – 55.

(24) Moore, M.M., Clive, D., Hozier, J.C, Howard, B.E., Batson, A.G, Turner, N.T. and Sawyer, J. (1985). Analysis of Trifluorothymidine – Resistant (TFTr) Mutants of L5178Y/TK$^{+/-}$ Mouse Lymphoma Cells. Mutation Res., 151, 161 – 174.

(25) Yandell, D.W., Dryja, T.P. and Little, J.B. (1990). Molecular Genetic Analysis of Recessive Mutations at a Heterozygous Autosomal Locus in Human Cells. Mutation Res., 229. 89 – 102.

(26) Moore, M.M. and Doerr, C.L. (1990). Comparison of Chromosome Aberration Frequency and Small – Colony TK – Deficient Mutant Frequency in L5178Y/TK$^{+/-}$ – 3.7.2C Mouse Lymphoma Cells. Mutagenesis, 5, 609 – 614.

▼B

B. 18. **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 tri ciom (^{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.

▼B

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.

▼B

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.

▼B

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.

▼B

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

▼B

B.19. **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 chromatídami duplikovaných chromozómov. SCE predstavuje výmenu produktov DNA replikácie v zdanlivo homo logických 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

1.6.1. *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.

▼B

— 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.

1.6.2. *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.

1.6.3. *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.

▼B

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.

Údaje by mali byť vyhodnotené vhodnou štatistickou metódou.

▼B

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.

▼B

B.20. **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 samce 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).

▼B

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

Samce 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 spermatid, 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 žiadne samce 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.

▼B

Pri vyhodnocovaní testov na pohlavie viazanú recesívnu letalitu by sa mali použiť vhodné štatistické metódy. Zhlukovanie recesívnych letálnych mutácií pochádzajúcich z jedného samca sa skúma a vyhodnocuje 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.

▼B

B.21. **TESTY BUNKOVEJ TRANSFORMÁCIE CICAVČÍCH BUNIEK *IN VITRO***

1. **METÓDA**

1.1. ÚVOD

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Systémy kultúr cicavčích buniek sa používajú na určenie fenotypových zmien indukovaných *in vitro* chemickými látkami, ktoré súvisia s malígnou transformáciou *in vivo*. Medzi často používané bunky patria $C3H10T_{1/2}$, 3T3, SHE, Fischer bunky potkanov. Testy sa zakladajú na zmenách bunkovej morfológie, vytváraní ohnísk alebo zmenách v schopnosti priľnúť na polopevnom agare. Existujú aj menej používané systémy, ktoré detekujú iné fyziologické a morfologické zmeny v bunkách, vznikajúce ako dôsledok vystavenia karcinogénnym chemikáliám. Žiadny zo záverov *in vitro* testov nepreukázal mechanické spojenie s rakovinou. Niektoré z testovacích systémov majú schopnosť odhaľovať nádorové promótory. Cytotoxicita sa môže určiť meraním vplyvu testovaného materiálu na schopnosti tvorby kolónií (klonovacia účinnosť) alebo meraním rýchlosti rastu kultúr. Meranie cytotoxicity má za cieľ preukázať, že vystavenie testovanej chemikálii bolo toxikologicky závažné, ale nemôže sa použiť na výpočet frekvencie transformácií vo všetkých testoch, keďže niektoré môžu vyžadovať predĺženú inkubáciu a/alebo opätovné naočkovanie.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

Príprava

B u n k y

Dostupné sú rozmanité bunkové línie alebo primárne bunky a to v závislosti od použitého transformačného testu. Výskumník musí zaručiť, aby bunky v uskutočňovanom teste vykazovali vhodnú zmenu fenotypu po vystavení známym karcinogénom a aby test v laboratóriu výskumníka bol dokázateľne platný, spoľahlivý a zdokumentovaný.

M é d i u m

Používajú sa médiá a experimentálne podmienky, ktoré zodpovedajú používanému transformačnému testu.

▼B

Testovaná látka

Testované látky sa môžu pripraviť v kultivačnom médiu alebo rozpustiť, alebo rozsuspendovať vo vhodnom nosiči predtým, ako dôjde k ovplyvneniu buniek. Konečná koncentrácia nosiča v kultivačnom systéme by nemala ovplyvňovať životaschopnosť bunky, rýchlosť rastu alebo výskyt transformácií.

Metabolická aktivácia

Bunky majú byť vystavené testovanej látke tak v prítomnosti, ako aj v neprítomnosti vhodného metabolického aktivačného systému. V eventuálnom prípade, keď sa používajú typy buniek s endogénnou metabolickou aktivitou, by malo byť známe, že povaha aktivity je vhodná pre testované chemické triedy.

Testovacie podmienky

Použitie negatívnych a pozitívnych kontrol

Pozitívne kontroly, ktoré využívajú priamo pôsobiace zlúčeniny a zlúčeniny vyžadujúce metabolickú aktiváciu, majú byť súčasťou každého experimentu; negatívnu kontrolu (nosič) je taktiež potrebné použiť.

Nasledujú príklady látok, ktoré môžu byť použité ako pozitívna kontrola:

— priamo pôsobiace chemikálie:

  — etylmetánsulfonát,

  — β-propiolaktón,

— zlúčeniny vyžadujúce metabolickú aktiváciu:

  — 2-acetylaminofluorén,

  — 4-dimetylaminoazobenzén,

  — 7,12-dimetylbenzantracén.

V prípade, že je to primerané, mala by sa zahrnúť ďalšia pozitívna kontrola rovnakej chemickej triedy, ako je testovaná látka.

Koncentrácie vystavenia

Používa sa niekoľko koncentrácií testovanej látky. Tieto koncentrácie majú poskytovať toxický efekt spôsobený koncentráciou, najvyššia koncentrácia spôsobujúca nízku úroveň prežívania a prežívanie pri najnižšej koncentrácii by malo byť približne rovnaké ako pri negatívnej kontrole. Vo vode ťažko rozpustné látky sa majú testovať až do úrovne rozpustnosti s použitím vhodných postupov. Pre voľne rozpustné netoxické látky sa horná koncentrácia testovanej látky určuje od prípadu k prípadu.

▼B

Postup

Na základe použitého testovacieho systému sa bunky ovplyvňujú počas primeraného časového intervalu a ak je vystavenie predĺžené, môže zahŕňať opätovné vystavenie sprevádzané výmenou živnej pôdy (a ak je nevyhnutné, čerstvou zmesou metabolického aktivátora). Bunky bez dostatočnej endogénnej metabolickej aktivity sa vystavujú testovanej látke ako v prítomnosti tak aj v neprítomnosti vhodného metabolického aktivačného systému. Na konci doby vystavenia sa bunky premyjú, zbavia testovanej látky a kultivujú za podmienok vhodných na monitorovanie transformovaného fenotypu a stanoví sa rozsah zistených transformácií. Všetky výsledky sa potvrdia nezávislým experimentom.

2. **ÚDAJE**

Údaje sa prezentujú vo forme tabuliek v rôznych formách v závislosti na uskutočnenom teste, napr. zhodnotenie platní, pozitívne platne alebo počet transformovaných buniek. V prípadoch, kde je to možné, prežívanie sa má vyjadriť ako percento úrovne hodnôt kontrolných vzoriek a frekvencia transformácie sa má vyjadriť ako počet transformantov na počet prežívajúcich buniek. Údaje sa vyhodnocujú pomocou vhodných štatistických metód.

3. **SPRÁVA**

3.1. SPRÁVA Z TESTU

V prípade, že je to možné, správa z testu obsahuje nasledujúce informácie:

— použitý typ buniek, počet bunkových kultúr, metódy na udržiavanie bunkových kultúr,

— testovacie podmienky, koncentrácia testovanej látky, použitý nosič, inkubačný čas, trvanie a frekvenciu ovplyvňovania, hustotu buniek počas ovplyvňovania, typ použitého exogénneho metabolického aktivačného systému, pozitívne a negatívne kontroly, špecifikáciu sledovaného fenotypu, použitý selekčný systém (ak je potrebný), odôvodnenie výberu dávok,

— použité metódy na výpočet počtu životaschopných a transformovaných buniek,

— štatistické vyhodnotenie,

— diskusiu o výsledkoch,

— interpretáciu výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

▼B

B.22. **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. Pred-implantačné straty sa môžu stanoviť na základe počítania žltých teliesok *(corpora luted)* 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.

▼B

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.

Jednotlivé samce 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.

▼B

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 pároniami.

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,

▼B

— štatistické vyhodnotenie,

— diskusia o výsledkoch,

— interpretácia výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

▼B

B.23. **TEST SPERMATOGONÁLNEJ CHROMOZÓMOVEJ ODCHÝLKY U CICAVCOV**

1. **METÓDA**

Táto metóda je obdobou OECD TG 483, testu spermatogonálnej chromozómovej odchýlky u cicavcov (1997).

1.1. ÚVOD

Účelom testu spermatogonálnej chromozómovej odchýlky u cicavcov je identifikovať látky, ktoré spôsobujú štrukturálne chromozómové odchýlky v spermatogonálnych bunkách cicavcov (1) (2) (3) (4)(5). Štrukturálne chromozómové odchýlky sa vyskytujú v dvoch typoch, chromozómové alebo chromatidové. Väčšina chemických mutagénov indukuje odchýlky chromatidového typu, vyskytujú sa však aj odchýlky chromozómového typu. Táto metóda nie je určená na meranie numerických odchýlok a na tento účel sa bežne nepoužíva. Chromozómové mutácie a podobné udalosti sú príčinou mnohých ľudských genetických chorôb.

Tento test meria chromozómové udalosti v spermatogonálnych zárodočných bunkách, a preto sa predpokladá, že predpovedá vznik dedičných mutácií v zárodočných bunkách.

Pri tomto teste sa zvyčajne používajú hlodavce. Tento *in vivo* cytogenetický test zisťuje chromozómové odchýlky v spermatogonálnych mitózach. Iné cieľové bunky tomuto testu nepodliehajú.

Na zistenie odchýlok chromatidového typu v spermatogonálnych bunkách sa skúma prvé delenie mitotických buniek po podaní ešte predtým, ako sa tieto lézie stratia v následných deleniach buniek. Dodatočné informácie z ošetrených spermatogonálnych kmeňových buniek sa získavajú analýzou meiotických chromozómov na odchýlky chromozómového typu pri diakinetickej metafáze I, keď sa ošetrené bunky stanú spermatocytmi.

Tento *in vivo* test skúma, či mutagény somatických buniek sú tiež aktívne v zárodočných bunkách. Spermatogonálny test je ďalej relevantný pre hodnotenie mutagénneho rizika tým, že umožňuje posúdenie faktorov *in vivo* metabolizmu, farmakokinetiky a opravných procesov DNA. V semenníkoch je prítomné množstvo generácií spermatogónií so spektrom citlivosti na chemické látky.

Zistené odchýlky preto predstavujú celkovú reakciu vystavených populácií spermatogonálnych buniek s prevládajúcimi početnejšími diferencovanými spermatogonálnymi bunkami. Rôzne generácie spermatogónií sú alebo nie sú exponované všeobecnou cirkuláciou v závislosti od ich pozície v semenníkoch, kvôli fyzickej a fyziologickej bariére Sertoliho buniek a bariére krvi v semenníkoch.

Ak existujú dôkazy, že testovacia látka alebo reaktívny metabolit nedosiahne cieľové tkanivo, nie je vhodné tento test použiť.

Pozri tiež všeobecný úvod k časti B.

▼B

1.2. DEFINÍCIE

Odchýlka chromatidového typu: štrukturálne chromozómové poškodenie prejavujúce sa ako pretrhnutie jednotlivých chromatidov alebo pretrhnutie a opätovné spojenie medzi chromatidmi.

Odchýlka chromozómového typu: štrukturálne chromozómové poškodenie prejavujúce sa ako pretrhnutie alebo pretrhnutie a opätovné spojenie oboch chromatidov na rovnakom mieste.

Trhlina: achromatická lézia menšia ako šírka jedného chromatidu s minimálnym posunutím chromatidov.

Numerická odchýlka: zmena v počte chromozómov v porovnaní s normálnou numerickou charakteristikou použitých buniek.

Polyploidia: násobok haploidného chromozómového čísla n) odlišného od diploidného čísla (t. j. 3n, 4n atď.)

Štrukturálna odchýlka: zmena v chromozómovej štruktúre rozpoznateľná mikroskopickým skúmaním metafázového štádia delenia buniek, pozorovaná ako delenia a fragmenty, intrazmeny alebo interzmeny.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Zvieratá sú exponované príslušným spôsobom testovacou látkou a utratené vo vhodnom čase po podaní látky. Pred utratením sa zvieratá ošetria prostriedkom zastavujúcim metafázu (napr Colcemidom® alebo colchicinom). Následne sa zo zárodočných buniek urobia chromozómové prípravky, zafarbia sa a metafázové bunky sa analyzujú na chromozómové odchýlky.

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Prípravné práce**

1.4.1.1. *Výber živočíšnych druhov*

Najbežnejšie sa používajú samce čínskych morčiat a myší. Použiť sa dajú samce iného vhodného druhu cicavcov. Vyberajú sa bežne používané laboratórne rody mladých zdravých dospelých zvierat. Na začiatku štúdie by mala byť hmotnostná variácia zvierat minimálna a nemala by presiahnuť ± 20 % strednej hmotnosti každého pohlavia.

1.4.1.2. *Podmienky umiestnenia a kŕmenia*

Používajú sa všeobecné podmienky uvedené vo všeobecnom úvode k časti B, cieľovou hodnotou vlhkosti je 50 % až 60 %.

1.4.1.3. *Príprava zvierat*

Zdravé mladé dospelé zvieratá sa náhodne rozdelia do kontrolných a pokusných skupín. Klietky sú umiestnené tak, aby sa minimalizovali možné účinky vyplývajúce z rozmiestnenia klietok. Zvieratá sa jednotlivo označia. Zvieratá sa aklimatizujú na laboratórne podmienky najmenej päť dní pred začatím štúdie.

▼B

1.4.1.4. *Príprava dávok*

Pevné testovacie látky sa rozpúšťajú alebo ukladajú v príslušných rozpúšťadlách alebo nosičoch, a ak je to vhodné, rozrieďujú pred podávaním dávok zvieratám. Kvapalné testovacie látky sa podávajú priamo alebo pred podávaním rozriedené. Používajú sa čerstvé prípravky testovacej látky, pokiaľ údaje o stabilite nepoukazujú na vhodnosť uskladnenia.

1.4.2. **Podmienky testov**

1.4.2.1. *Rozpúšťadlo/nosič*

Rozpúšťadlo/nosič by nemali vyvolávať toxické účinky na používaných úrovniach dávok. Nemali by chemicky reagovať s testovacou látkou. Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by malo byť podporené údajmi označujúcimi ich kompatibilitu. Odporúča sa zvážiť, ak je to možné, použitie vodného rozpúšťadla/nosiča.

1.4.2.2. *Kontrolné skupiny*

Pri každom pokuse sa vytvoria pozitívne a negatívne (rozpúšťadlo/-nosič) kontrolné skupiny. Okrem podania testovacej látky sa so zvieratami v kontrolných skupinách zaobchádza rovnakým spôsobom ako s pokusnými zvieratami.

Pozitívna kontrolná skupina vytvára štrukturálne odchýlky *in vivo* v spermatogonálnych bunkách pri podaní na úrovniach expozície, pri ktorých sa očakáva zistiteľný nárast na pozadí.

Dávky pozitívnej kontrolnej skupiny sa volia tak, aby boli účinky zjavné, ale aby pozorovateľovi priamo neodhaľovali identitu kódovaných vzoriek. Je prijateľné, aby pozitívnym kontrolným skupinám boli látky podávané spôsobom odlišným od testovacej látky a vzorky z nich boli odoberané iba raz. Ak sú dostupné, môže sa zvážiť použitie chemikálií pre pozitívnu kontrolnú skupinu príbuzných v triede chemikálií. Príklady látok pre pozitívnu kontrolnú skupinu:

Látka	Číslo CAS	Číslo EINECS
Cyklofosfamid monohydrát cyklofosfamidu	50-18-0 6055-19-2	200-015-4
Cyklohexamin	108-91-8	203-629-0
Mitomycin C	50-07-7	200-008-6
Monomerický akrylamid	79-06-1	201-173-7
Trietylénmelamín	51-18-3	200-083-5

Pre každý odber vzoriek sa odoberú vzorky aj z negatívnych kontrolných skupín, iba s rozpúšťadlom alebo nosičom, a inak ošetrovaných rovnakým spôsobom ako pokusné skupiny, pokiaľ nie sú z historických kontrolných údajov dostupné údaje o variabilite medzi zvieratami a frekvenciách buniek s chromozómovou odchýlkou. Používajú sa aj neošetrené kontrolné skupiny, pokiaľ neexistujú historické kontrolné údaje demonštrujúce, že vybrané rozpúšťadlo alebo nosič nespôsobujú žiadne rušivé alebo mutagénne efekty.

▼B

1.5. POSTUP

1.5.1. **Počet zvierat**

Každá pokusná a kontrolná skupina obsahuje najmenej päť analyzovateľných zvierat.

1.5.2. **Harmonogram ošetrovania**

Testovacie látky sa podávajú jeden alebo dvakrát (t. j. ako jedno podanie alebo dve podania). Testovacie látky môžu byť podávané aj v dvoch dávkach, t. j. dve podania v jeden deň po niekoľkých hodinách po sebe na uľahčenie podania veľkého objemu látky. Iné dávkovacie režimy sa vedecky zdôvodnia.

V skupine s najvyššou dávkou sa uskutočnia dva odbery vzoriek. Keďže kinetika bunkového cyklu môže byť ovplyvnená testovacou látkou, vzorky sa odoberajú v dvoch rôznych časoch po ošetrení, prvýkrát skôr a druhýkrát neskôr, približne 24 a 48 hodín po podaní. Pre dávky prekračujúce najvyššiu dávku sa odber uskutoční po 24 hodinách alebo pri 1,5 násobku dĺžky bežného bunkového cyklu po podaní, pokiaľ nie je známe, že pre zistenie účinkov je vhodnejší iný čas (6).

Vzorky sa môžu ďalej odoberať v iných časoch. Napríklad v prípade chemikálií, ktoré môžu indukovať zaostávanie chromozómov alebo vyvolávať účinky nezávislé od S, sú vhodné skoršie časy odberu vzoriek (1).

Vhodnosť opakovaného harmonogramu podávania sa identifikuje z prípadu na prípad. Po opakovanom harmonograme podávania sa zvieratá utratia po 24 hodinách (1,5 násobok dĺžky bunkového cyklu) od posledného podania. Kde je to vhodné, môžu sa uskutočniť ďalšie odbery vzoriek.

Pred utratením sa zvieratám injekčne intraperitoneálne podáva vhodná dávka prostriedku zastavujúceho metafázu (napr Colcemid® alebo colchicin). Po vhodnom čase sa následne zo zvierat odoberajú vzorky. U myší je tento interval približne 3 – 5 hodín; u čínskych morčiat približne 4 – 5 hodín.

1.5.3. **Úrovne dávok**

Ak sa z dôvodu nedostatku vhodných údajov uskutoční štúdia na zistenie rozsahu, vykoná sa v rovnakom laboratóriu, za použitia rovnakého druhu, kmeňa, pohlavia a dávkovacieho režimu ako v hlavnej štúdii (7). Ak sa vyskytuje toxicita, pre prvý odber vzorky sa používajú tri úrovne dávok. Tieto úrovne dávok pokrývajú rozsah od maximálnej po malú, rsp. žiadnu toxicitu. Pri neskoršom odbere vzorky sa používa len najvyššia dávka. Najvyššia dávka sa definuje ako známka toxicity z dávky na takej úrovni, že vyššie úrovne dávkovania založené na rovnakom dávkovacom režime by pravdepodobne spôsobili úmrtnosť.

▼B

Látky so špecifickými biologickými aktivitami pri nízkych netoxických dávkach (ako napríklad hormóny a mitogény) môžu byť výnimkou kritéria stanovenia dávky a hodnotia sa z prípadu na prípad. Najvyššia dávka sa tiež definuje ako dávka, ktorá spôsobí určité príznaky toxicity v spermatogonálnych bunkách (napríklad: zníženie pomeru spermatogonálnej mitózy k prvej a druhej meiotickej metafáze; toto zníženie by nemalo presiahnuť 50 %).

1.5.4. **Limitný test**

Ak test pri jednom objeme dávky najmenej 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti pri jednom podaní alebo pri dvoch podaniach v jeden deň nevyvoláva žiadne toxické účinky a ak sa neočakáva genotoxicita na základe údajov zo štrukturálne príbuzných látok, úplná štúdia pri použití troch hladín dávkovania sa nepovažuje za potrebnú. Očakávaná expozícia na ľudí môže naznačovať potrebu vyššieho objemu dávky pri použití limitného testu.

1.5.5. **Podávanie dávok**

Testovacia látka sa zvyčajne podáva plnením žalúdka sondou s použitím žalúdočnej rúrky alebo vhodnej intubačnej kanyly alebo intraperitoneálnou injekciou. Iné cesty expozície sú prijateľné len so zdôvodnením. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže naraz podávať sondou alebo injekciou, závisí od veľkosti testovacieho zvieraťa. Objem by nemal presiahnuť 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Použitie objemov vyšších ako tento sa musí zdôvodniť. Okrem dráždivých alebo žieravých látok, ktoré bežne odhalia zhoršené účinky s vyššími koncentráciami, sa variabilita testovacieho objemu minimalizuje upravením koncentrácie na zabezpečenie stáleho objemu na všetkých úrovniach dávok.

1.5.6. **Príprava chromozómov**

Ihneď po utratení sa získavajú bunkové suspenzie z jedného alebo oboch testov, ktoré sa vystavia hypotonickému roztoku a fixujú sa. Bunky sa potom umiestnia na sklíčka a zafarbia.

1.5.7. **Analýza**

Od každého zvieraťa sa analyzuje najmenej 100 dobre rozšírených metafáz (t. j. minimálne 500 metafáz na skupinu). Tento počet je možné znížiť pri pozorovaní vysokého počtu odchýlok. Všetky sklíčka, vrátane sklíčok z negatívnych a pozitívnych kontrolných skupín, sa pred mikroskopickou analýzou nezávisle označia kódmi. Keďže postupy fixácie často ústia do pretrhnutia časti metafázy so stratou chromozómov, označené bunky by mali obsahovať počet centromér rovnajúci sa hodnote $2n \pm 2$.

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje o jednotlivých zvieratách sa uvádzajú v tabuľkovej forme. Experimentálnou jednotkou je jedno zviera. Pre každé zviera sa hodnotí počet buniek so štrukturálnymi chromozómovými odchýlkami a počet chromozómových odchýlok na bunku. Rôzne typy štrukturálnych chromozómových odchýlok sa uvádzajú v zozname s ich číslami a frekvenciami pre pokusné a kontrolné skupiny. Trhliny sa zaznamenávajú oddelene a uvádzajú sa, ale zvyčajne sa neudávajú pri celkovej frekvencii odchýlok.

▼B

Ak je pozorovaná mitóza i meióza, pomer spermatogonálnych mitóz k prvej a druhej meiotickej metafáze sa stanoví ako meranie cytotoxicity pre všetky pokusné a negatívne kontrolné zvieratá pri celkovej vzorke 100 deliacich sa buniek na jedno zviera na účely stanovenia možného cytotoxického účinku. Ak je pozorovaná len mitóza, mitotický index sa stanovuje pre najmenej 1 000 buniek na jedno zviera.

2.2. HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Pre stanovenie pozitívneho výsledku existuje niekoľko kritérií, ako napríklad nárast relatívneho počtu buniek s chromozómovými odchýlkami spojený s dávkou alebo zjavný nárast počtu buniek s odchýlkami pri jednej dávke pri jednom odbere vzorky. Najprv sa zvažuje biologická relevantnosť výsledkov. Ako pomôcka sa pri hodnotení výsledkov testov používajú štatistické metódy (8). Štatistický význam nie je jediným určujúcim faktorom pre pozitívnu reakciu. Nejednoznačné výsledky sa objasňujú ďalším testovaním, najlepšie použitím modifikácie pokusných podmienok.

Testovacia látka s výsledkami, ktoré nespĺňajú vyššie uvedené kritériá, sa v tomto systéme považuje za nemutagénnu.

Hoci väčšina pokusov poskytne jednoznačne pozitívne alebo negatívne výsledky, v zriedkavých prípadoch údaje vopred vylúčia jednoznačné posúdenie aktivity testovacej látky. Výsledky môžu ostať nejasné alebo spochybniteľné bez ohľadu na počet opakovaní pokusu.

Pozitívne výsledky *in vivo* testu spermatogonálnej chromozómovej odchýlky naznačujú, že určitá látka vyvoláva štrukturálne chromozómové odchýlky v zárodočných bunkách testovaného druhu. Negatívne výsledky naznačujú, že v testovacích podmienkach testovacia látka neindukuje chromozómové odchýlky v zárodočných bunkách testovaného druhu.

Pravdepodobnosť, že testovacia látka alebo jej metabolity dosiahnu cieľové tkanivo, je predmetom diskusie.

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu zahŕňa nasledujúce informácie:

Rozpúšťadlo/nosič:

— zdôvodnenie voľby nosiča,

— rozpustnosť a stabilita testovacej látky v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa.

Testovacie zvieratá:

— použitý druh/kmeň,

— počet a vek zvierat,

— zdroj, podmienky chovu, strava atď.,

— individuálna hmotnosť zvierat na začiatku testu, vrátane rozsahu telesnej hmotnosti, strednej hodnoty a štandardnej odchýlky pre každú skupinu.

▼B

Podmienky testov:

— údaje zo štúdie na zistenie rozsahu, ak bola uskutočnená,

— zdôvodnenie voľby úrovne dávok,

— zdôvodnenie voľby spôsobu podávania,

— podrobnosti o príprave testovacej látky,

— podrobnosti o podávaní testovacej látky,

— zdôvodnenie času utratenia,

— konverzia z koncentrácie testovacej látky v strave/vode (ppm) na samotnú dávku (mg/kg/telesná hmotnosť/deň), ak je to vhodné,

— podrobnosti o kvalite stravy a vody,

— podrobný opis harmonogramu podávania a odberu vzoriek,

— metódy merania toxicity,

— identita látky zastavujúcej metafázu, jej koncentrácia a trvanie podávania,

— metódy prípravy sklíčok,

— kritériá pre hodnotenie odchýlok,

— počet analyzovaných buniek na jedno zviera,

— kritériá na hodnotenie pokusov ako pozitívne, negatívne alebo nejasné.

Výsledky:

— známky toxicity,

— mitotický index,

— pomer buniek spermatogonálnej mitózy k prvej a druhej meiotickej metafáze,

— typ a počet odchýlok uvádzaný samostatne na každé zviera,

— celkový počet odchýlok na skupinu,

— počet buniek s odchýlkami na skupinu,

— vzťah medzi dávkou a reakciou, ak je to možné,

— štatistické analýzy, ak boli použité,

— súčasné údaje o negatívnych kontrolných skupinách,

— historické údaje o negatívnych kontrolných skupinách, s rozsahmi, strednými hodnotami a štandardnými odchýlkami,

— súčasné údaje o pozitívnych kontrolných skupinách,

— zmeny ploidie, ak boli pozorované.

Rozbor výsledkov

Závery

▼B

4. **LITERATÚRA**

(1) Adler, I.D. (1986). Clastogenic Potential in Mouse Spermatogonia of Chemical Mutagens Related to their Cell-Cycle Specifications. In: Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Ramel, C, Lambert, B. and Magnusson, J. (Eds.) Liss, New York, pp. 477 – 484.

(2) Adler, I.D., (1984). Cytogenetic tests in Mammals. In: Mutagenicity Testing: a Practical Approach. Ed. S. Venitt and J.M. Parry. IRL Press, Oxford, Washington DC, pp. 275 – 306.

(3) Evans, E.P., Breckon, G. and Ford, C.E., (1964). An Air-Drying Method for Meiotic Preparations from Mammalian Testes. Cytogenetics and Cell Genetics, 3, 289 – 294.

(4) Richold, M., Ashby, J., Chandley, A., Gatehouse, D.G and Henderson, L. (1990). *In Vivo* Cytogenetic Assays, In: D.J. Kirkland (Ed.) Basic Mutagenicity Tests, UKEMS Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part I revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 115 – 141.

(5) Yamamoto, K. and Kikuchi, Y. (1978). A New Method for Preparation of Mammalian Spermatogonial Chromosomes. Mutation Res., 52, 207 – 209.

(6) Adler, I.D., Shelby M.D., Bootman, J., Favor, J., Generoso, W., Pacchierotti, F., Shibuya, T. and Tanaka N. (1994). International Workshop on Standardisation of Genotoxicity Test Procedures. Summary Report of the Working Group on Mammalian Germ Cell Tests. Mutation Res., 312, 313 – 318.

(7) Fielder, R.J., Allen, J.A., Boobis, A.R, Botham, P.A., Doe, I, Esdaile, D.J., Gatehouse, D.G, Hodson-Walker, G, Morton, D.B., Kirkland, DJ. and Richold, M. (1992). Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working group: Dose setting in *In Vivo* Mutagenicity Assays. Mutagenesis, 7, 313 – 319.

(8) Lovell, D.P., Anderson, D., Albanese, R, Amphlett, G.E., Clare, G, Ferguson, R, Richold, M., Papworth, D.G. and Savage, J.RK. (1989). Statistical Analysis of *In Vivo* Cytogenetic Assays In: D. J. Kirkland (Ed.) Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184 – 232.

▼B

B.24. **SPOT TEST U MYŠÍ**

1. **METÓDA**

1.1. ÚVOD

Pozri všeobecný úvod časť E.

1.2. DEFINÍCIA

Pozri všeobecný úvod časť E.

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.

▼B

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).

▼B

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. SPRÁVA Z TESTU

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 (úrovne) 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,

— diskusia o výsledkoch,

— interpretácia výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

▼B

B.25. **DEDIČNÁ TRANSLOKÁCIA U MYŠÍ**

1. **METÓDA**

1.1. ÚVOD

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Test dedičnej translokácie u myší zisťuje štrukturálne a numerické chromozómové zmeny v cicavčích zárodočných bunkách po objavení sa v prvej generácii potomkov. Zistené typy chromozómových zmien sú recipročné translokácie a chromozómové straty v prípade, že je obsiahnuté samičie potomstvo. Nosiči translokácie a XO-samice vykazujú zníženú plodnosť, ktorá sa používa na selekciu F_1 potomstva pre cytogenetickú analýzu. Úplná neplodnosť je spôsobená istými typmi translokácií (X-autozóm, a c-t typ). Translokácie sa cytogeneticky pozorujú v meiotických bunkách v diakinéze metafázy I samčích jedincov, a to buď F_1 samcov, alebo samčieho potomstva F_1 samíc. XO-samice sa cytogeneticky identifikujú prostredníctvom prítomnosti iba 39 chromozómov v mitózach kostnej drene.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

Príprava

Testované chemikálie sa rozpustia v fyziologickom roztoku. Ak sú nerozpustné, rozpúšťajú sa alebo rozsuspendujú vo vhodnom nosiči. Využívajú sa čerstvo pripravené roztoky testovanej zlúčeniny. Ak je na uľahčenie dávkovania použitý nosič, nesmie vzájomne reagovať s testovanou zlúčeninou alebo spôsobovať toxické efekty.

Spôsob podávania

Orálna intubácia alebo intraperitoneálna injekcia sú zvyčajnými spôsobmi podávania. Vhodné sú aj iné spôsoby podávania.

Pokusné zvieratá

Pre prípad rozmnožovania a cytologického overovania sa pokusy vykonávajú s myšou. Nevyžaduje sa žiaden špecifický kmeň. Priemerná veľkosť vrhu kmeňa by však mala byť väčšia ako osem a mala by byť relatívne stála.

Používajú sa zdravé a pohlavne zrelé zvieratá.

▼B

Počet zvierat

Nevyhnutný počet zvierat závisí od frekvencie spontánnych translokácií a na získanie pozitívnych výsledkov sa vyžaduje minimálna rýchlosť indukcie.

Test sa zvyčajne vykonáva analýzou samčieho F_1 potomstva. Pre jednu dávkovú skupinu by sa malo testovať aspoň 500 samčích F_1 potomkov, 300 samcov a 300 samičiek sa požaduje v prípade, že sa zahŕňa samičie F_1 potomstvo.

Použitie negatívnej a pozitívnej kontroly

Dostupné by mali byť zodpovedajúce kontrolné dáta odvodené zo súbežnej a historickej kontroly. V prípade, že na základe súčasných pokusov prevedených v tom istom laboratóriu sú k dispozícii prijateľné výsledky pozitívnej kontroly, tieto výsledky sa môžu použiť miesto súbežnej pozitívnej kontroly.

Úrovne dávok

Testuje sa jedna úroveň dávky, zvyčajne najvyššia dávka spojená s produkciou minimálnych toxických efektov, ale bez vplyvu na reprodukčné správanie alebo prežívanie. Na zabezpečenie vzťahu dávky/efekt sa požadujú ďalšie dve nižšie dávky. Pre netoxické chemikálie by sa malo použiť vystavenie maximálnej dosiahnuteľnej dávke.

Postup

Ovplyvňovanie a párenie

K dispozícii sú dva harmonogramy ovplyvňovania. Jednorazové podávanie testovanej látky sa používa najčastejšie. Taktiež sa môže použiť podávanie testovanej látky v siedmy deň každého týždňa počas 35 dní. Počet párení nasledujúcich po ovplyvnení sa riadi harmonogramom ovplyvňovania a mal by zabezpečiť, že sa zachytia všetky štádiá zárodočných buniek. Na konci obdobia párenia sa samičky jednotlivo umiestnia do klietok. Keď samičky vrhnú, zaznamená sa dátum, veľkosť vrhu a pohlavie potomstva. Všetko samčie potomstvo sa odstaví a všetky samičie potomstvá sa odstránia, pokiaľ sa nepoužijú v pokuse.

Testovanie translokačnej heterozygozity

Používa sa jedna z dvoch možných metód:

— testovanie plodnosti F_1 potomstva a následné overenie možných nosičov translokácií pomocou cytogenetickej analýzy,

— cytogenetická analýza všetkých samčích F_1 potomkov bez predchádzajúcej selekcie testom plodnosti.

a) Testovanie plodnosti

Znížená plodnosť F_1 jedinca sa môže stanoviť pozorovaním veľkosti vrhu a/alebo analýzou obsahov maternice samičích krížencov.

Pre každý myší kmeň sa musia stanoviť kritériá pre určovanie normálnej a zníženej plodnosti.

▼B

Pozorovanie veľkosti vrhu: testované F_1 samce sa umiestnia jednotlivo do klietok so samičkami z toho istého pokusu alebo kolónie. Klietky sa prezerajú denne počnúc po 18. dňoch od párenia. Veľkosť vrhu a pohlavie F_2 potomstva sa zaznamená pri narodení a vrhy sú následne zničené. Ak sa testujú samičie F_1 potomstvá, F_2 potomstvá malých vrhov sa ponechajú pre ďalšie testovanie. Nosiči samičích translokácií sa overia cytogenetickou analýzou translokácie pre ich každého samčieho potomka. XO-samičky sa rozpoznajú prostredníctvom zmeny v pohlavnom pomere spomedzi ich potomstva od hodnoty 1: 1 na 1: 2 samcov vs. samíc. V nasledujúcom kroku postupu sa F_1 zvieratá vylúčia z ďalšieho testovania v prípade, že prvý F_2 vrh dosiahne alebo prekročí predurčenú normálnu hodnotu. Inak sa pozoruje druhý alebo tretí F_2 vrh.

F_1 zvieratá, ktoré sa po pozorovaní až do tretieho vrhu nemôžu klasifikovať ako normálne, sa buď ďalej testujú analýzou obsahu maternice samičích krížencov, alebo sú priamo podrobené cytogenetickej analýze.

Analýza maternicového obsahu: Zníženie veľkosti vrhu nosičov translokácií je spôsobené odumretím embryí, takže vysoký počet mŕtvych implantátov naznačuje prítomnosť translokácií u testovaného zvieraťa. Každý testovaný samec F_1 sa pári s dvomi alebo tromi samicami. Počatie sa stanovuje denne ranným vyšetrením vaginálnej zátky. Samice sa usmrtia po uplynutí 14 až 16 dní a zaznamenajú sa žijúce a mŕtve implantáty, ktoré sa nachádzajú v ich maternici.

b) Cytogenetická analýza

Preparáty semenníkov sa vytvoria pomocou techniky sušenia na vzduchu. Nosiči translokácií sa určia pomocou prítomnosti multivalentných konfigurácií počas diakinézy metafázy I v primárnych spermatocytoch. Pozorovania aspoň dvoch buniek s multivalentnými vzťahmi sú základom požadovaného dôkazu, že testované zviera je nosičom translokácie.

Ak sa nevykonala selekcia vrhu, všetky samce F_1 sa vyšetria cytogeneticky. Mikroskopicky sa musí vyhodnotiť minimálne 25 buniek v štádiu diakinézy metafázy I na jedného samca. Pri samčekoch F_1 s malými semenníkmi a prerušením meiózy pred diakinézou alebo pri samičkách F_1 s podozrením na XO sa vyžaduje vyšetrenie mitotických metafáz v spermatogóniách alebo kostnej dreni. Prítomnosť nezvyčajne dlhého a/alebo krátkeho chromozómu v každej z 10 buniek je dôkazom určitej translokácie samčej sterility (c-t typ). Niektoré translokácie X-autozómu, ktoré spôsobujú samčiu sterilitu, sa dajú identifikovať iba prúžkovacou analýzou mitotických chromozómov. Prítomnosť 39 chromozómov vo všetkých 10 mitózach je dôkazom pre XO stav samice.

2. **ÚDAJE**

Údaje sa prezentujú vo forme tabuliek.

Pre každé obdobie párenia sa zaznamená priemerná veľkosť vrhu a pomer pohlaví z krížení rodičov pri narodení a pri odstavení.

▼B

Na potvrdenie plodnosti zvierat F_1 generácie sa uvádza priemerná veľkosť vrhu všetkých normálnych párení a veľkosť každého jednotlivého vrhu nosičov translokácie F_1. Na analýzu obsahu maternice sa uvádza priemerný počet žijúcich a mŕtvych implantátov pri normálnych pároniach a jednotlivé počty žijúcich a mŕtvych implantátov pri každom párení nosičov F_1 translokácie.

Na cytogenetickú analýzu diakinézy metafázy I sa pre každého nosiča translokácie uvádza počet typov multivalentných konfigurácií a celkový počet buniek.

Pre sterilných F_1 jedincov sa uvádza celkový počet párení a trvanie obdobia párenia. Uvedená je hmotnosť semenníkov a podrobnosti cytogenetickej analýzy.

Pre XO samice je uvedená priemerná veľkosť vrhu, pomer pohlaví v F_1 potomstve a výsledky cytogenetickej analýzy.

Ak je to možné, nosiči F_1 translokácií sa vopred selektujú testmi plodnosti. Tabuľky musia zahŕňať informácie o tom, pri koľkých z nich sa potvrdila translokačná heterozygozita.

Uvádzané sú údaje z experimentov s negatívnou a pozitívnou kontrolou.

3. SPRÁVA

3.1. SPRÁVA Z TESTU

V prípade, že je to možné, správa z testu obsahuje tieto informácie:

— kmeň myší, vek zvierat, hmotnosť ovplyvnených zvierat,

— počet rodičovských zvierat každého pohlavia v experimentálnej a kontrolnej skupine,

— podmienky testu, podrobný opis ovplyvnenia, úrovne dávok, rozpúšťadlá, harmonogram párenia,

— počet a pohlavie potomkov na samicu, počet a pohlavie potomkov zohraných na analýzu translokácie,

— čas a kritériá analýzy translokácie,

— ak je to možné, počet a podrobný opis nosičov translokácie zahŕňajúci údaje o chove a údaje o obsahu maternice,

— cytogenetické metódy a podrobnosti o mikroskopickej analýze, pokiaľ možno s obrázkami,

— štatistické vyhodnotenie,

— diskusiu o výsledkoch,

— interpretáciu výsledkov.

▼B

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

▼B

B.26. **TEST SUBCHRONICKEJ ORÁLNEJ TOXICITY 90-DŇOVÁ ŠTÚDIA ORÁLNEJ TOXICITY U HLODAVCOV/TEST V OPAKOVANÝCH DÁVKACH**

1. **METÓDA**

Táto testovacia metóda subchronickej toxicity je kópia OECD TG 408 (1998).

1.1. ÚVOD

Stanovenie a vyhodnotenie charakteristík toxicity danej chemickej látky, zistenie subchronickej orálnej toxicity metódou opakovaných dávok sa dá vykonať až po získaní východiskových informácií o toxicite z krátkodobých alebo 28-dňových testov. Táto 90-dňová štúdia poskytuje informácie o možných rizikách ohrozenia zdravia, ktoré pravdepodobne vznikajú vplyvom opakovaného pôsobenia počas dlhšieho časového obdobia, ktoré zahŕňa post-dojčiace, dospievanie a vývoj až do dospelosti. Štúdia poskytuje informácie o závažných toxických účinkoch, indikuje zasiahnuté orgány a možnosti akumulácie a umožňuje odhadnúť stupeň pôsobenia nezistených škodlivých účinkov, ktorý sa dá následne využiť pri výbere objemu dávok na dlhodobé štúdie a pri stanovení bezpečnostných kritérií ohľadom ich pôsobenia na človeka.

Táto metóda kladie dodatočný dôraz na neurologické koncové body a ponúka indikáciu imunologických a reprodukčných účinkov. Taktiež sa v nej zdôrazňuje nutnosť dôkladných klinických pozorovaní zvierat s cieľom získať čo najväčšie množstvo informácií. Táto štúdia umožňuje, aby sa pri identifikácii chemických látok bral do úvahy aj ich potenciál vplývať na orgány neurotoxickými, imunologickými účinkami a taktiež účinkami na reprodukciu, z čoho vyplýva následné hĺbkové skúmanie.

Pozri Všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIE

Dávka: množstvo podávanej testovanej látky. Dávka je vyjadrená ako hmotnosť (g, mg) alebo ako hmotnosť testovanej látky na jednotkovú hmotnosť testovaného zvieraťa (napr. mg/kg) alebo konštantné dietetické koncentrácie (ppm).

Dávkovanie: všeobecný pojem, ktorý zahŕňa dávku, jej frekvenciu a trvanie.

NOAEL: skratka pre stupeň nezistených škodlivých účinkov, je najvyššou možnou dávkou, pri ktorej sa neobjavili žiadne škodlivé nálezy v súvislosti s liečbou.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Testovaná látka sa podáva denne niekoľkým skupinám pokusných zvierat vo zvýšených dávkach, každá skupina zvierat dostáva určitú dávku počas 90 dní. V priebehu tohto obdobia sa na zvieratách dôkladne skúmajú príznaky toxicity. Zvieratá, ktoré počas testu uhynú, sú následne pitvané a taktiež zvieratá, ktoré prežijú, sú na záver testu usmrtené a podrobené pitve.

▼B

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Príprava zvierat**

Na test sa použijú zdravé zvieratá, ktoré sa aspoň päť dní aklimatizovali na laboratórne podmienky a ktoré neboli predtým podrobené žiadnym pokusom. Druh, rod, pôvod, pohlavie, váhu a/alebo vek zvierat sú presne stanovené. Do skupín budú zvieratá zadelené náhodným výberom a na takomto princípe sa budú vyberať aj na kontrolu. Klietky sa umiestnia v takom poradí, aby sa možné účinky vzhľadom na umiestnenie klietky minimalizovali. Každému zvieraťu sa pridelí identifikačné číslo.

1.4.2. **Príprava dávok**

Testovaná látka sa podáva cez trubicu priamo do žalúdka alebo v potrave alebo v pitnej vode. Metóda orálneho podávania závisí od účelu štúdie a fyzikálno-chemických vlastností testovanej látky.

Látka sa podáva buď rozpustená alebo rozptýlená vo vhodnom materiáli. Odporúča sa, ak je to potrebné, uvažovať o použití vodných roztokov/suspenzií ako prvých v poradí, následne o roztokoch/-emulziách v oleji (napr. kukuričnom) a až potom o roztokoch v iných materiáloch. Pri iných materiáloch ako voda je vhodné zistiť ich toxickú charakteristiku. Počas podávania testovanej látky je nevyhnutné zaistiť jej stálosť.

1.4.3. **Podmienky testu**

1.4.3.1. *Pokusné zvieratá*

Najvhodnejším zvieraťom je potkan, hoci sa môžu použiť aj iné hlodavce, napr. myši. Bežne sa používajú laboratórne druhy mladých zdravých dospelých zvierat. Samičky musia byť neplodné a neoplodnené. Dávkovanie musí začať čo najskôr po odstavení mláďat a skôr než zvieratá dovŕšia deväť týždňov. Na začiatku štúdie váhové odchýlky u zvierat sú minimálne a neprevyšujú ± 20 % priemernej váhy oboch pohlaví. Ak sa táto štúdia uskutočňuje ako predbežná k dlhodobej štúdii chronickej toxicity, v oboch štúdiách by sa mali použiť zvieratá toho istého druhu.

1.4.3.2. *Množstvo a pohlavie*

Na každej úrovni podávania dávok by sa malo použiť aspoň 20 zvierat (10 samičiek a 10 samčekov). Ak sa medzitým naplánuje usmrtenie nejakých zvierat, mal by sa pred ukončením štúdie počet o tieto doplniť do pôvodného množstva pred usmrtením zvierat. Na základe doposiaľ získaných znalostí o danej chemickej látke alebo inej príbuznej látke sa odporúča po uplynutí testovaného obdobia venovať pozornosť, vrátane ďalšej satelitnej skupiny 10 zvierat (po piatich z každého pohlavia), kontrole a pozorovaniam skupiny s najvyššími dávkami, vratnosti a trvácnosti akýchkoľvek toxických účinkov. Trvanie tohto obdobia sa presne stanoví po uplynutí expozície s ohľadom na spozorované účinky.

▼B

1.4.3.3. *Úrovne dávkovania*

Bolo by vhodné absolvovať tento test aspoň na troch úrovniach so súbežnou kontrolou, okrem prípadov, v ktorých prebieha limitný test (pozri 1.4.3.4). Výšky dávkovania sa môžu zakladať na výsledkoch opakovaného dávkovania alebo mnohých zisťovacích štúdií a je potrebné prihliadať aj na jestvujúce toxikologické a toxickokinetické údaje, ktoré sú o testovanej látke alebo príbuzných látkach k dispozícii. Ak to nie je obmedzené fyzikálnochemickou podstatou alebo biologickými účinkami testovanej látky, najvyššia hladina dávky by sa mala vybrať s cieľom vyvolať toxicitu, ale nie smrteľné alebo kruté utrpenie. Potom by sa malo prejsť na zostupnú postupnosť objemu dávkovania so zámerom preukázať, že každá dávka má za následok účinok a že nebol spozorovaný škodlivý účinok pri najnižšej úrovni dávkovania (NOAEL). Na stanovenie zostupného dávkovania sú optimálne dvoj- až trojnásobné intervaly a pri štvrtej testovanej skupine sa odporúča dodržať veľmi veľké intervaly (napr. viac ako faktor 6-10) medzi dávkami.

Kontrolná skupina by mala byť neexponovaná skupina alebo skupina na kontrolu nosiča, ak sa nosič používa pri podávaní testovanej látky. Bez ohľadu na aplikovanie testovanej látky, so zvieratami v kontrolnej skupine by sa malo zaobchádzať rovnakým spôsobom ako s tými, ktoré sú v testovanej skupine. Ak sa použije nosič, kontrolná skupina dostane tento v čo najväčšom množstve. Ak sa testovaná látka podáva v potrave a spôsobuje redukciu príjmu potravy, potom je vhodné použiť dve súčasne kŕmené kontrolné skupiny na odlíšenie redukcie zapríčinenej nechutenstvom alebo toxikologickými zmenami testovanej vzorky.

Náležitá pozornosť by sa mala venovať nasledujúcim vlastnostiam nosiča a ostatným aditívam: účinky na absorpciu, distribúciu, metabolizmus alebo retencia testovanej látky; účinky na chemické vlastnosti testovanej látky, ktoré môžu pozmeniť jej toxické vlastnosti a vplyvy na spotrebu krmiva a vody alebo na stav výživy zvierat.

1.4.3.4. *Limitný test*

Ak sa počas testu pri jednej úrovni dávkovania, s dávkami aspoň 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň a pri dodržaní postupov opísaných v tejto štúdii, nezískajú žiadne údaje o škodlivých účinkoch a ak toxicita nedosiahne očakávanú úroveň na základe údajov na štrukturálne príbuzné látky, potom vôbec nie je potrebné uvažovať o komplexnej štúdii s tromi úrovňami. Limitný test sa nepoužije v prípadoch, ak pôsobenie látky na človeka indikuje potrebu vyššej úrovne dávkovania.

1.5. POSTUP

1.5.1. **Podávaná dávka**

Zvieratám sa podáva dávka s testovanou látkou denne počas siedmich dní v týždni po obdobie 90 dní. Použitie každého iného režimu dávkovania, napr. päť dní v týždni, musí byť opodstatnené. Ak je testovaná látka podávaná trubicou, musí sa toto vykonať v jednej dávke pre zviera, s použitím žalúdočnej trubice alebo vhodnej intubačnej kanyly. Maximálny objem kvapaliny, ktorý môže byť naraz podaný, závisí od veľkosti testovaného zvieraťa. Objem nesmie presiahnuť 1 ml/100 g telesnej hmotnosti, s výnimkou prípadu vodných roztokov, kde sa môže použiť dávkovanie 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Variabilita testovaných objemov sa zminimalizuje nastavením/adjustáciou/koncentrácií s cieľom zaistenia konštantných objemov vo všetkých úrovniach dávkovania. S výnimkou dráždivých alebo žieravých látok, ktoré za normálnych okolností preukazujú zhoršujúci sa účinok vo vysokých koncentráciách, variabilita/odlišnosti/testovaných objemov sa minimalizuje určením koncentrácií tak, aby sa zaistil konštantný objem na všetky hladiny dávkovania.

▼B

Pre látky, ktoré sú podávané spolu s potravou alebo pitnou vodou, je dôležité zabezpečiť, aby množstvo obsiahnutých testovaných látok neinterferovalo s normálnou nutričnou hodnotou alebo vodnou rovnováhou. Ak je testovaná látka podávaná v potrave, môže sa použiť buď konštantná stravná koncentrácia, (ppm) alebo konštantná úroveň dávkovania s ohľadom na telesnú hmotnosť zvieraťa; alternatívne používanie je potrebné špecifikovať. Dávka látok podávaných cez trubicu sa musí podávať každý deň v rovnakom čase a musí sa regulovať tak, aby sa udržiavala konštantná úroveň dávkovania so zreteľom na telesnú hmotnosť zvieraťa. Ak sa uplatňuje 90-dňová štúdia ako predbežná k dlhodobej štúdii chemickej toxicity, je potrebné použiť rovnakú potravu v oboch štúdiách.

1.5.2. **Pozorovania**

Doba pozorovania by mala trvať aspoň 90 dní. Zvieratá v satelitných skupinách, určené podľa plánu na kontrolné pozorovania, by na určitý čas nemali byť vystavené pôsobeniu testovanej látky, aby sa detegovala stálosť alebo aby sa zotavili z toxických účinkov.

Všeobecné klinické pozorovania by sa mali vykonávať najmenej raz denne, najmä v rovnakom čase každý deň, berúc do úvahy vrchol doby predvídaných účinkov po dávkovaní. Klinické podmienky zvierat musia byť zaznamenané. Všetky zvieratá sa podrobia kontrole patologických zmien a mortality najmenej dvakrát denne, obvykle na začiatku a konci každého dňa.

Detailné klinické pozorovania na všetkých zvieratách vykonáme najmenej raz pred prvou expozíciou (aby sa umožnilo porovnanie v rámci subjektov) a raz za týždeň po expozícií. Tieto pozorovania sa vykonávajú mimo domu, klietky, radšej v štandardnej aréne a v podobnom čase pri každej príležitosti. Musia byť pozorne zaznamenané, s použitím hodnotiaceho systému explicitne definovaného testovacím laboratóriom. Je potrebné minimalizovať odlišnosti v podmienkach pozorovaní. Pozorované znaky zahŕňajú, ale nie sú limitované, zmeny na koži, kožušine, očiach, slizniciach, výskyt sekrécie a vylučovania autonómnej aktivity (ako napr. slzenie, piloerekcia, veľkosť zreníc, neobvyklé dýchanie). Zmeny v chôdzi, držaní tela a odozve na zaobchádzanie, ako aj prítomnosť kónických alebo napätých pohybov, stereotypov (napr. opakované točenie sa), prílišné ošetrovanie sa alebo zvláštne správanie (napr. chôdza dozadu, sebaznetvorenie) musia byť tiež zaznamenané.

Oftalmologické vyšetrenia, pri ktorých sa používajú oftalmoskopy alebo iné ekvivalentné vhodné zariadenia, sa vykonávajú pred podaním testovanej látky a po ukončení štúdie najlepšie na všetkých zvieratách, ale najmenej v skupine s vysokou dávkou a v kontrolnej skupine. Ak sa zistia zmeny na očiach, musia byť všetky zvieratá otestované.

Ku koncu expozičnej periódy a v žiadnom prípade nie skôr ako v jedenástom týždni sa skontroluje senzorická reaktivita na stimuláciu rôznych typov (1), napr. zvuková, vizuálna a proprioceptívna stimulácia (2), (3), (4), odhadnutie intenzity zovretia (5) a odhad motorickej aktivity (6). Ďalšie podrobnosti o postupoch, ktoré môžu nasledovať, sú dané v uvedenej použitej literatúre. Je možné použiť aj iné alternatívne postupy k tomu, čo tu bolo doposiaľ napísané.

Pozorovanie funkčných porúch vykonávané ku koncu štúdie možno vynechať, ak sú údaje o pozorovaní funkčných porúch dostupné z iných štúdií a ak denné klinické pozorovanie neprekáža žiadnej funkčnej poruche.

▼B

Výnimočne je možné vynechať funkčné pozorovania pre skupiny s inými znakmi stupňa toxicity, značne interferujú s funkčným testom na účinnosť.

1.5.2.1. *Telesná hmotnosť a spotreba potravy/vody*

Všetky zvieratá sa musia vážiť najmenej raz za týždeň. Meranie spotreby potravy sa robí najmenej raz za týždeň. Ak sa testovaná látka podáva vo vode na pitie, spotreba vody sa musí merať raz za týždeň. Spotreba má tiež význam pre dietetické štúdie alebo štúdie s použitím trubice, počas ktorých sa môže meniť.

1.5.2.2. *Hematológia a klinická biochémia*

Krvné vzorky sa odoberajú z označených miest a uložia sa za vhodných podmienok. Na konci testovacej periódy sa vzorky zozbierajú práve pred utratením alebo ako časť procedúry utratenia zvierat.

Nasledujúce hematologické vyšetrenia sa vykonávajú na konci testovacej doby, ak sú všetky predbežné vzorky zozbierané: hematorit, koncentrácia hemoglobínu, počet erytrocytov, celkový diferenciálny počet leukocytov, počet krvných doštičiek, meranie zrážanlivosti krvi/potenciál.

Klinické biochemické stanovenia vyšetrujúce hlavné toxické účinky v tkanive a špecifický vplyv na obličky a pečeň sa vykonávajú na krvných vzorkách získaných od každého zvieraťa práve pred utratením alebo ako súčasť procedúry utratenia zvierat (okrem zistených ako umierajúcich a/alebo zabitých). V podobných metódach hematologických vyšetrení sa môže vykonať predložené vzorkovanie na klinické biochemické testy. Odporúča sa, aby sa zvieratá pred odobratím vzoriek krvi cez noc postili ([1]). Zisťovanie v plazme alebo sére zahŕňa sodík, draslík, glukózu, celkový cholesterol, močovinu, dusík z močoviny v krvi, kreatín, celkové bielkoviny a albumín a viac ako dva indikujúce hepatocelulárne (účinky na pečeňové bunky) účinky ako napr. alanín, amini-transferázy, aspartát aminotransferázy, alkalická fosfatáza, gama glutamyl transpeptidáza a sorbitol dehydrogenáza. Za istých okolností sem môžeme zahrnúť aj merania ďalších enzýmov (hepatické alebo iného pôvodu) a žlčových kyselín, ktoré môžu poskytnúť užitočné informácie.

Podľa potreby sa nasledujúce zistenia v analýzach moču môžu vykonať počas posledného týždňa štúdie a použije sa časový zber objemu moču: vzhľad, objem, osmolalita alebo špecifická váha, pH, bielkoviny, glukóza a krv/krvné bunky.

Okrem toho by sa mali brať do úvahy aj štúdie na vyšetrovanie sérových markerov v základných poškodených tkanivách. Ostatné zisťovanie je možné uskutočniť, ak poznáme vlastnosti, ktoré môžu alebo sa o nich predpokladá, že vplývajú na príbuzné metabolické profily zahrňujúce vápnik, fosfor urýchľovacie triglyceridy, špecifické hormóny, methemoglobín a cholinesterázu. Preto je ich nutné identifikovať ako chemické látky v určitých triedach alebo ako individuálne v závislosti od prípadu.

([1]) Pri množstve meraní v sére a plazme, najvýznamnejšie na meranie glukózy, sa preferuje nechať zvierat cez noc bez potravy. Hlavný dôvod tohto uprednostňovania je, že zvýšená variabilita, ktorá je nutným následkom pri podávaní stravy/nepostení sa/, môže mať tendenciu zakryť nepatrné účinky, a tým sťažiť následné vyhodnotenie. Na druhej strane, hoci celonočný pôst môže interferovať s obecným metabolizmom zvierat a predovšetkým v štúdiách o kŕmení, denné pôsobenie testovanej látky sa týmto môže narušiť. Ak sa pristúpi na celonočný pôst, klinické biochemické stanovenia sa vykonajú po kontrole funkčných pozorovaní štúdie.

▼B

Celkove je potrebný flexibilný prístup, ktorý závisí od druhov a pozorovaných a/alebo očakávaných účinkov danej látky.

Ak sú historické základné údaje neprimerane, je treba zvážiť, či premenné hematologické a premenné klinickej biochémie je potrebné stanoviť pred začatím dávkovania, nie je všeobecne odporučené, aby tieto údaje boli zisťované pred liečbou.

1.5.2.3. *Všeobecná pitva*

Všetky zvieratá v štúdií budú predmetom úplnej detailnej pitvy, ktorá zahŕňa podrobné vyšetrenie externého povrchu tela a všetkých telesných otvorov a lebečnej, hrudnej a brušnej dutiny. Pečeň, obličky, nadobličky, semenníky, nadsemenníky, maternica, vaječníky, týmus, slezina, mozog a srdce zo všetkých zvierat (okrem tých, ktoré chradnú a/alebo zvierat, ktoré boli predtým utratené) by sa mali pitvať na nejakej priľnavej tkanine a je potrebné čo najrýchlejšie zistiť ich mokrú hmotnosť skôr, ako pri pitve vyschnú.

Nasledujúce tkanivá by mali uchovávať v čo najvhodnejšom fixačnom médiu na obidva typy tkanív a na následné histopatologické skúšky: všetky závažné poškodenia, mozog/reprezentatívne oblasti, zahrňujúce veľký mozog, mozoček, Varolov most/, miecha (v troch úrovniach: krčná, hrudná, bedrová), hypofýza, štítna žľaza, prištítna žľaza, týmus, pažerák, slinné žľazy, žalúdok, tenké a hrubé črevo, Peyerove žľazy, pečeň, obličky, pankreas, nadobličky, slezina, srdce, priedušnica a pľúcne laloky (ochránené nafúknutím, fixáciou a potom ponorením), aorta, gonády, maternica, prídavné pohlavné orgány, samičie mliečne žľazy, prostata, močový mechúr, žlčník, lymfatické uzliny (uprednostňujúc jednu lymfatickú uzlinu pokrývajúcu cestu šírenia a druhú, vzdialenú od tejto cesty šírenia na pokrytie systémového vplyvu), periférne nervy (sedacie alebo holenné) najlepšie v tesnej blízkosti svalov, časť kostnej drene (a/alebo získať čerstvú kostnú dreň), koža a oči (ak boli zistené zmeny počas oftalmologických vyšetrení). Z klinických a iných nálezov môže vyplynúť potreba vyšetrenia ďalších dodatočných tkanív. Takisto by mali ostať zachované orgány považované za cieľové orgány, založené na známych vlastnostiach testovanej látky.

1.5.2.4. *Histopatológia*

Úplná histopatológia sa uskutoční na uskladnených orgánoch a tkanivách všetkých zvierat v kontrolnej skupine a v skupinách s vysokými dávkami. Tieto skúšky sa rozšíria o zvieratá zo všetkých skupín s odlišným dávkovaním, ak boli zistené zmeny v skupine s vysokými dávkami.

Preskúmajú sa všetky závažné poškodenia.

Ak boli použité satelitné skupiny, histopatológia sa vykoná na tkanivách a orgánoch identifikovaných ako vykazujúce účinky v spracovaných skupinách.

1.5.2.5. *Preskúmajú sa všetky závažné poškodenia.*

Ak boli použité satelitné skupiny, histopatológia sa vykoná na tkanivách a orgánoch identifikovaných ako vykazujúce účinky v spracovaných skupinách.

▼B

2. **ÚDAJE A HLÁSENIE**

2.1. ÚDAJE

Po získaní jednotlivých údajov sa všetky tieto následne zosumarizujú v tabuľkovej forme, vykazujúcej na každú testovanú skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet nájdených mŕtvych zvierat počas testu alebo usmrtených z humanitných dôvodov a čas smrti alebo čas usmrtenia z humanitných dôvodov, počet vykázaných znakov toxicity, opis zistených znakov toxicity, zahrňujúcich čas vzniku, trvanie sily toxických účinkov, počet zvierat vykazujúcich lézie (poškodenia), typ lézií a percento zvierat vykazujúcich každý typ lézie.

Ak je to možné, numerické výsledky sa vyhodnotia vhodnou a všeobecne uplatniteľnou metódou. Štatistické metódy a údaje, ktoré sa podrobia analýze, sa vyberú počas prípravy koncepcie štúdie.

2.2. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí obsahovať nasledujúce informácie:

2.2.1. **Testovaná látka:**

— fyzikálny charakter a fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikačné údaje,

— nosič (ak je to vhodné): opodstatnenosť výberu nosiča, ak je iný ako voda.

2.2.2. **Testovaný druh:**

— druhy a rody používaných zvierat,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky uskladňovania, potrava atď.,

— individuálne hmotnosti zvierat na začiatku testu.

2.2.3. **Podmienky testu:**

— odôvodnenie na výber úrovne hladiny dávky,

— podrobnosti formulácie testovanej látky/príprav a potravy, dosiahnutá koncentrácia, stabilita a homogenita prípravy,

— podrobnosti o podávaní testovanej látky,

— aktuálne dávky (mg/kg telesnej hmotnosti/deň) a faktov konverzie z potravy/pitnej vody, testovanej látky, koncentrácia na aktuálnu dávku,

— detaily o kvalite potravy a vody.

2.2.4. **Výsledky:**

— telesná hmotnosť a zmeny telesnej hmotnosti,

— spotreba potravy a spotreba vody, ak je to možné,

— údaje o toxikologickej reakcii podľa pohlavia a úrovne dávky, zahrňujúce známky toxicity,

▼B

— charakter, prudkosť a trvanie klinických pozorovaní (či sú reverzibilné alebo nie),

— výsledky oftalmologických vyšetrení,

— odhad senzorickej aktivity, intenzity stlačenia, zovretia a motorickej aktivity (ak sú informácie k dispozícii),

— hematologické testy s významnými základnými hodnotami,

— klinické biochemické vyšetrenia s príslušnými výstupnými normálnymi hodnotami,

— konečná telesná hmotnosť, hmotnosť orgánov a pomer hmotnosti orgánov k telesnej hmotnosti,

— pitevné nálezy,

— detailné opisy všetkých histopatologických nálezov,

— absorpčné údaje, ak sú dostupné,

— štatisticky spracované výsledky, ak je to vhodné.

Diskusia o výsledkoch

Závery

3. **POUŽITÁ LITERATÚRA**

(1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

(2) Tupper, D.E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999 – 1003.

(3) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J.Toxicol. Environ. Health, 9, 691 – 704.

(4) Moser, V.C., Mc Daniel, K.M., Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol, 108, 267 – 283.

(5) Meyer O.A., Tilson H.A., Byrd W.C., Riley M.T. (1979). A Method for the Routine Assesment of Fore- and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxivol., 1, 233 – 236.

(6) Crofton K.M., Howard J.L., Moser V.C., Gill M.W., Reiter L.W., Tilson H. A., MacPhail R.C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599 – 609.

(7) Weingand K., Brown G., Hall R. *et al.* (1996). „Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies“, Fundam. & Appl. Toxicol., 29, 198 – 201.

▼B

B.27. **TEST SUBCHRONICKEJ ORÁLNEJ TOXICITY: OPAKOVANÁ 90-DŇOVÁ ŠTÚDIA ORÁLNEJ TOXICITY U NEHLODAVCOV**

1. **METÓDA**

Táto testovacia metóda subchronickej orálnej toxicity je kópiou OECD TG 409 (1998).

1.1. ÚVOD

Stanovenie a vyhodnotenie toxických charakteristík toxicity chemikálie, stanovenie subchronickej orálnej toxicity metódou opakovaných dávok, môže byť vykonané až po získaní východiskových informácií o toxicite z krátkodobých alebo 28-dňových testov metódou opakovaných dávok. 90-dňová štúdia poskytuje informácie o možných rizikách ohrozenia zdravia, ktoré môžu vzniknúť pri opakovanom vystavení sa počas obdobia rýchleho rastu a do mladej dospelosti: Štúdia poskytuje informácie o hlavných toxických účinkoch, určuje cieľové orgány a možnosti akumulácie. Ďalej umožňuje odhad úrovne nezistených nepriaznivých účinkov pôsobenia látky, ktoré je možné použiť pri výbere úrovne dávok na dlhodobé štúdie a na ustanovenie bezpečnostných kritérií s ohľadom na ich vplyv na človeka.

Testovacia metóda umožňuje identifikáciu nepriaznivých účinkov pôsobenia na druhy nehlodavcov a používa sa iba:

— ak účinky zistené inými štúdiami indikujú potrebu vyjasnenia/-charakterizácie v druhom druhu nehlodavcov alebo

— ak toxiko-kinetická štúdia indikuje, že použitie špecifických nehlodavých druhov je najdôležitejším výberom laboratórnych zvierat, alebo

— ak iné špecifické dôvody zdôvodňujú použite nehlodavých druhov.

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIE

Dávka: množstvo podávanej testovanej látky. Dávka je vyjadrená ako hmotnosť (g, mg) alebo ako hmotnosť testovanej látky per jednotkovú hmotnosť testovaného zvieraťa (napr. mg/kg) alebo konštantné dietetické koncentrácie (ppm).

Dávkovanie: všeobecný pojem, ktorý zahŕňa dávku, jej frekvenciu a trvanie.

NOAEL: skratka pre stupeň nezistených škodlivých účinkov a je najvyššou možnou dávkou, pri ktorej sa neobjavili žiadne škodlivé nálezy v súvislosti s liečbou.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Testovaná látka je podávaná denne, orálne, v odstupňovaných dávkach niekoľkým skupinám testovaných zvierat, jedna úroveň dávky na skupinu počas 90-tich dní. Počas tohto obdobia sú na zvieratách dôkladne pozorované prípadné znaky toxicity látok. Zvieratá, ktoré uhynú alebo sú usmrtené počas testu, sú pitvané a na záver testu sú usmrtené a pitvané aj zvieratá, ktoré prežili.

▼B

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Výber druhov zvierat**

Obvykle používaný druh nehlodavcov je pes, ktorý by mal mať definované plemeno, často je používaný druh malého stavača. Môžeme tiež použiť aj iné druhy ako napr. ošípané, mini-prasiatka. Primáty sa neodporúčajú a ich použitie musí byť odôvodnené. Používajú sa mladé zdravé zvieratá a v prípade psov dávkovanie začína v 4 – 6. mesiaci a nie neskôr ako v 9. mesiaci veku psa. Ak je štúdia usmerňovaná ako predbežná dlhodobá štúdia chronickej toxicity, musia sa použiť v obidvoch štúdiách rovnaké plemená/druhy.

1.4.2. **Príprava zvierat**

Môžu sa použiť mladé zdravé zvieratá, ktoré sa aklimatizovali v laboratórnych podmienkach a neboli predmetom predchádzajúcich experimentálnych postupov. Dĺžka aklimatizácie závisí od vybraných testovaných druhov a ich zdrojov. Odporúča sa najmä 5 dní pre psov alebo účelovo chované ošípané s rezidentských kolónií a najmenej dva týždne pre tie zvieratá, ktoré sú z vonkajších zdrojov. Testované zvieratá majú byť charakterizované podľa druhu, rodu, zdroja, pohlavia, hmotnosti a/alebo veku. Zvieratá by mali byť postupne zadelené do kontrolných a liečebných skupín. Klietky by mali byť umiestnené takým spôsobom, aby sa minimalizoval vplyv vzhľadom na ich rozmiestnenie. Každé zviera by malo byť označené svojim identifikačným číslom.

1.4.3. **Príprava dávok**

Testovaná dávka sa podáva v potrave alebo v pitnej vode cez trubicu priamo do žalúdka alebo v kapsulách. Metóda orálneho podávania závisí od účelu štúdie a fyzikálno-chemických vlastností testovaného materiálu.

V prípade potreby sa testovaná látka rozpustí alebo vytvorí suspenziu vo vhodnom nosiči. Odporúča sa, aby sa vždy, ak je to možné, uvažovalo o použití vodných roztokov/suspenzií ako prvých v poradí, nasledovaných vážením roztoku/emulzie v oleji (napr. kukuričný olej) a až potom o možných roztokoch v iných nosičoch. Charakteristiky toxicity nosičov iných ako voda musia byť známe. Stanoví sa stabilita testovanej látky za podmienok podávania.

1.5. POSTUP

1.5.1. **Počet a pohlavie zvierat**

Pre každú úroveň dávky sa použije aspoň 8 zvierat (štyri samice a štyri samce). Ak sa plánujú predbežné usmrtenia, počet zvierat by mal byť zvýšený o plánovaný počet zvierat, ktoré majú byť usmrtené pred kompletizáciou štúdie. Počet zvierat, ktoré ukončia štúdiu, musí byť primeraný na zmysluplné vyhodnotenie toxických účinkov. Na základe predošlých znalostí o látke alebo jej blízkych analógoch dôraz sa kladie na zahrnutie doplnkových satelitných skupín s ôsmimi zvieratami (štyri na každé pohlavie) v kontrolnej skupine a v skupine s najvyšším dávkovaním na pozorovanie reverzibility po období, ak boli podrobené vplyvu nejakých toxických účinkov. Trvanie tohto obdobia po vystavení účinkom sa stanoví s ohľadom na zistené vplyvy.

▼B

1.5.2. **Dávkovanie**

Tento test je vhodné vykonať najmenej v troch hladinách dávky a súbežne kontrolovať, s výnimkou testov, v ktorých sa prevádza limitný test (pozri 1.5.3). Úroveň dávky sa môže zakladať na výsledkoch štúdií opakovaného dávkovania alebo štúdií rozsahu nálezov a malo by sa prihliadať na existujúce toxikologické a toxikokinetické údaje dostupné na testovanú zlúčeninu alebo príbuzné materiály. Ak to nie je limitované fyzikálno-chemickou podstatou alebo biologickými účinkami testovanej látky, najvyššia dávka by sa mala vybrať s cieľom vyvolať toxicitu, ale nie úhyn alebo kruté utrpenie. Potom prejdeme na klesajúcu postupnosť úrovne hladín dávkovania so zámerom preukázať, že každá dávka má za následok reakciu, odozvu a že nebol pozorovaný škodlivý účinok pri najnižšej hladine dávkovania (NOAEL). Dvoj- až štvornásobné intervaly sú často optimálne pri stanovení zostupných hladín dávkovania a pre dodatočnú štvrtú testovanú skupinu sa často dodržiavajú veľmi veľké odstupy (napr. viac ako faktor 6-10) medzi dávkami.

Kontrolná skupina je skupina, ktorá nebola podrobená účinkom testovaných materiálov, alebo skupina kontroly nosiča, ak bol nosič používaný pri podávaní testovanej látky. Bez ohľadu na aplikovanie testovanej látky, so zvieratami v kontrolnej skupine zaobchádzame rovnakým spôsobom ako s tými, ktoré sú v testovanej skupine. Ak sa použije nosič, kontrolná skupina ho dostane v čo najväčšom množstve. Ak sa testovaná látka podáva v potrave a spôsobuje redukciu príjmu potravy, potom je vhodné použiť dve súčasne kŕmené skupiny na rozlíšenie zníženia príjmu potravy kvôli nechutenstvu alebo toxikologickým zmenám v testovacom modeli.

Je potrebné venovať náležitú pozornosť nasledujúcim vlastnostiam nosiča a iných aditív: vplyv na absorpciu, distribúciu, metabolizmus alebo zadržiavanie testovanej látky, vplyvy na chemické vlastnosti testovanej látky, ktoré môžu zmeniť svoje toxické vlastnosti, vplyv na spotrebu potravy a vody alebo na stav výživy zvierat.

1.5.3. **Limitný test**

Ak test pri jednej hladine dávkovania ekvivalentnej najmenej 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň, ktorý využíva postupy opísané v tejto štúdii, neposkytne údaje o zistených škodlivých účinkoch a ak ich toxicita nebola na očakávanej úrovni na základe z údajov pre látky s príbuznou štruktúrou, potom nie je potrebné uvažovať o úplnej štúdii, ktorá využíva tri hladiny dávkovania. Limitný test sa uplatňuje, ak pôsobenie na človeka poukazuje potrebu použitia vyššej hladiny dávkovania.

1.5.4. **Podávanie dávok**

Zvieratám sa aplikuje dávka s testovacou látkou denne počas siedmich dní v týždni v období 90-tich dní. Použitie každého iného režimu dávkovania, napr. 5 dní v týždni, musí byť opodstatnené. Ak je testovaná látka podávaná cez trubicu, musí sa to realizovať v jednej dávke pre zviera za použitia žalúdočnej trubice alebo vhodnej intubačnej kanyly. Maximálny objem kvapaliny, ktorý môže byť naraz podaný, závisí od veľkosti testovaného zvieraťa. Obvykle je objem čo najmenší. S výnimkou dráždivých alebo korozívnych látok, ktoré bežne preukazujú zhoršujúci sa účinok vo vysokých koncentráciách, variabilita testovaných objemov sa minimalizuje nastavením koncentrácií tak, aby sa zaistil konštantný objem pre všetky hladiny dávkovania.

▼B

Pre látky, ktoré sú podávané ako súčasť potravy alebo pitnej vody, je dôležité zaistiť, aby množstvo obsiahnutej testovanej látky neinterferovalo s normálnou nutričnou hodnotou alebo vodnou rovnováhou. Ak je testovaná látka podávaná v potrave, je možné použiť buď konštantnú dietetickú koncentráciu (ppm), alebo konštantnú hladinu dávkovania s ohľadom na telesnú hmotnosť zvieraťa. Látky podávané cez trubicu alebo v kapsuliach podávame každý deň v rovnakom čase a nastavíme ich dávkovanie tak, aby sa dodržalo konštantné dávkovanie vzhľadom na telesnú hmotnosť zvieraťa. Ak sa 90-dňová štúdia použije ako predbežná štúdia na dlhodobú štúdiu chronickej toxicity, podávame podobnú potravu v obidvoch štúdiách.

1.5.5. **Pozorovania**

Doba pozorovania má byť najmenej 90 dní. Zvieratá v satelitných skupinách, naplánované na nasledujúce pozorovania, budú určitú dobu bez vystavenia účinkom testov s cieľom detegovať stálosť alebo zotavenie sa z toxických účinkov.

Všeobecné klinické pozorovania sa budú vykonávať najmenej raz denne, najlepšie každý deň v rovnakom čase, s ohľadom na vrchol doby očakávaných účinkov po dávkovaní. Klinické podmienky zvierat musia byť zaznamenané najmenej dvakrát denne, obvykle na začiatku a konci dňa sú zvieratá podrobené kontrole patologických zmien a úmrtnosti.

Detailné klinické pozorovania na všetkých zvieratách sa vykonajú najmenej jedenkrát pred prvou expozíciou (aby sa umožnilo v rámci subjektov porovnanie), raz za týždeň po expozícií. Tieto pozorovania sa vykonávajú v domovskej klietke v štandardnej aréne a najlepšie v rovnakom čase pri každej príležitosti. Je potrebné minimalizovať odlišnosti v podmienkach pozorovaním. Známky toxicity musia byť podrobne zaznamenané, musia zahŕňať čas nasadenia, stupeň a trvanie. Ak nie sú pozorovania limitované, musia obsahovať zmeny na pokožke, kožušine, očiach, slizniciach, výskyt sekrétov a vylučovanie a automatické činnosti (napr. lakrimácia, pilo-erekcia, veľkosť zreníc, neobvyklé dýchanie). Zaznamenané budú: zmeny v chôdzi, držaní tela, v reakcii na manipuláciu, ako aj prítomnosť klonických alebo napätých pohybov, stereotypy (napr. točenie, nadmerné čistenie) alebo iné zvláštne správanie.

Oftalmologické vyšetrenia, pri ktorých sa používajú oftalmoskopy a iné ekvivalentné vhodné zariadenia, sa vykonávajú pred podávaním testovanej látky a po ukončení štúdie, najlepšie na všetkých zvieratách, ale najmenej v skupine s vysokými dávkami a v kontrolnej skupine. Ak sa po vystavení zvierat účinkom látky zistia zmeny na očiach, musia byť vyšetrené všetky zvieratá.

1.5.5.1. *Telesná hmotnosť, spotreba vody a potravy*

Všetky zvieratá sa musia vážiť najmenej raz za týždeň. Meranie spotreby potravy sa robí týždenne. Ak sa testovaná látka podáva vo vode na pitie, spotrebu vody je tiež potrebné merať raz za týždeň. Spotreba vody môže byť tiež významná na dietetické štúdie alebo štúdie s použitím trubice, počas ktorých je možné túto meniť.

▼B

1.5.5.2. *Hematológia a klinická biochémia*

Krvné vzorky sa odoberajú z označených miest a uložia sa za vhodných podmienok. Na konci testovacej periódy sa vzorky zozbierajú práve pred alebo ako súčasť procedúry utratenia zvierat.

Hematológia vrátane hematokrit, koncentrácia hemoglobínu, počet erytrocytov, celkový a diferenciálny počet leukocytov, počet krvných doštičiek a meranie potenciálu zrážanlivosti, ako napríklad doba zrážanlivosti, doba protrombínu alebo tromboplastov, sa vyšetruje na začiatku štúdie, potom v mesačných intervaloch alebo v polovici testovacej periódy a na konci testovacej periódy.

Klinické biochemické vyšetrenia, ktoré skúmajú hlavne toxické vplyvy na tkanivá a špecifický účinok na pečeň alebo obličky, sa vykonajú na krvných vzorkách, získaných od zvierat na začiatku, potom v mesačných intervaloch alebo v polovici testovacej periódy a na konci testovacej periódy. Pozornosť sa upriami najmä na tieto testované parametre: rovnováha elektrolytov, metabolizmus karbohydrátov, funkcia pečene a obličiek. Výber špecifických testov ovplyvňuje pozorovania druhov reakcií na testovanú látku. Zvieratá by sa mali postiť pred odberom krvných vzoriek, počas obdobia vhodného na daný druh. Navrhované vyšetrenia zahŕňajú stanovenie vápnika, fosforu, chloridov, sodíka, draslíka, glukózy, alanínaminotransferázy, aspartátu aminotransferázy, ornithínu, dekarboxylázy, gama-glutamyl, transpeptidázy, močovinového dusíka, albumínu, krvného kreatínu, celkového bilirubínu a celkový protein v sére.

Vyšetrenia moču sa vykonávajú najmenej na začiatku, potom v strede a na konci štúdie, pri ktorej sa využíva časový zber objemu moču. Vyšetrenia zahŕňajú vzhľad, objem, osmolalitu alebo špecifickú hmotnosť, pH, bielkovinu, glukózu a krv alebo krvné bunky. Dodatočné parametre môžu byť vyšetrované, ak je potrebné rozšíriť vyšetrovanie získaných účinkov.

Okrem toho sa zvažuje vykonanie štúdie vyšetrujúcej markery základných poškodených tkanív. Iné stanovenia, ktoré môžu byť potrebné na primerané toxikologické vyhodnotenie, zahŕňajú analýzu lipidov, hormónov, acido/bazickú rovnováhu, methemoglobín a inhibíciu cholinesterázy. Dodatočne sa môže uskutočniť aj ďalšia klinická biochémia, ak je potrebné rozšíriť vyšetrenie zistených účinkov. Je ich potrebné identifikovať pre chemické látky v určitých skupinách alebo posúdiť prípad po prípade.

Celkovo sa požaduje flexibilný prístup, ktorý závisí od druhu zvierat a pozorovaných a/alebo očakávaných účinkov danej látky.

1.5.5.3. *Všeobecná, celková pitva*

Všetky zvieratá v štúdii budú predmetom úplnej detailnej všeobecnej pitvy, ktorá zahŕňa pozorné vyšetrenie vonkajšieho povrchu tela, všetkých telesných otvorov a lebečnej, hrudnej, brušnej dutiny a ich obsahu. Pečeň, žlčník, obličky, nadobličky, semenníky, nadsemenníky, vaječníky, maternica, štítna žľaza spolu s prištítnou žľazou, týmus, slezina, mozog a srdce zo všetkých zvierat (okrem tých, u ktorých sa zistilo chradnutie alebo predchádzajúce utratenie) by mali byť upravené na nejakej priľnavej tkanine a ich mokrá hmotnosť sa zistí čo najskôr, kým orgány pri pitve nevyschnú.

▼B

Tieto tkanivá by sa mali uchovávať v čo najvhodnejšom fixačnom médiu na obidva typy tkanív a na neskoršie histopatologické skúšky: všetky závažné poškodenia, mozog (reprezentatívne oblasti zahrňujúce veľký mozog, mozoček, Varolov most, miecha (v troch úrovniach: krčná, hrudná, bedrová), hypofýza, štítna žľaza, prištítna žľaza, týmus, pažerák, slinné žľazy, žalúdok, tenké a hrubé črevo, Peyerove žľazy, pečeň, pankreas, obličky, nadobličky, slezina, srdce, priedušnica a pľúcne laloky (ochránené nafúknutím, fixáciou a potom ponorením), aorta, gonády, maternica, prídavné pohlavné orgány, samičie mliečne žľazy, prostata, močový mechúr, žlčník, lymfatické uzliny (uprednostňujúc jednu lymfatickú uzlinu pokrývajúcu cestu šírenia a druhú, vzdialenú od tejto cesty, šírenia pokrytia systematických účinkov), periférne nervy (sedacie alebo holenné), najlepšie v tesnej blízkosti svalov, časť kostnej drene (a/alebo získať čerstvú kostnú dreň), koža a oči (ak boli zistené zmeny počas oftalmologických vyšetrení). Z klinických a iných nálezov môže vyplynúť potreba vyšetrenia ďalších následných tkanív. Takisto by sa mali zachovať orgány považované za cieľové orgány, založené na známych vlastnostiach testovanej látky.

1.5.5.4. *Histopatológia*

Úplná histopatológia sa uskutoční na uskladnených orgánoch a tkanivách všetkých zvierat v kontrolnej skupine a v skupinách s vysokými dávkami. Tieto skúšky sa rozšíria o zvieratá zo všetkých skupín s odlišným dávkovaním, ak boli zistené zmeny v skupine s vysokými dávkami.

Všetky závažné poškodenia budú preskúmané.

Ak boli použité satelitné skupiny, histopatológia sa vykoná na tkanivách a orgánoch identifikovaných ako vykazujúce účinky v spracovaných skupinách.

2. ÚDAJE A SPRÁVA

2.1. ÚDAJE

Po získaní jednotlivých údajov sa tieto zosumarizujú v tabuľkovej forme, vykazujúcej pre každú testovanú skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet nájdených mŕtvych zvierat počas testu alebo usmrtených z humanitných dôvodov a čas smrti alebo čas usmrtenia z humanitných dôvodov, počet vykázaných znakov toxicity, opis zistených znakov toxicity, zahrňujúcich čas vzniku, trvanie sily toxických účinkov, počet zvierat vykazujúcich lézie (poškodenia), typ lézií a percento zvierat vykazujúcich každý typ lézie.

Ak je to možné, numerické výsledky budú spracované vhodne a všeobecne uplatniteľnou metódou. Štatistické metódy a údaje, ktoré budú analyzované, budú vybraté počas tvorby dizajnu štúdie.

2.2. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí obsahovať nasledujúce informácie:

▼B

2.2.1. **Testovaná látka:**

— fyzikálny charakter a fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikačné údaje,

— nosič (ak je to vhodné): opodstatnenie výberu nosiča, ak je iný ako voda.

2.2.2. **Testovaný druh:**

— druhy a rody používaných zvierat,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky uskladnenia, potrava atď.,

— individuálne hmotnosti zvierat na začiatku testu.

2.2.3. **Podmienky skúšky (testu):**

— odôvodnenie na výber hladiny dávky,

— detaily o testovanej látke, formulácia/príprava potravy, dosiahnuté koncentrácie, stabilita a homogenita prípravy,

— detaily o podávaní testovanej látky,

— aktuálne dávky (mg/kg telesnej hmotnosti/deň), faktor konverzie z potravy/pitnej vody, koncentrácia testovanej látky v (ppm), ak je to možné,

— detaily o kvalite potravy a vody.

2.2.4. **Výsledky:**

— telesná hmotnosť a zmeny telesnej hmotnosti,

— spotreba potravy a spotreba vody, ak je to možné,

— údaje o toxikologickej reakcii podľa pohlavia a úrovne dávky, zahrňujúce známky toxicity,

— charakter, tvrdosť a trvanie klinických pozorovaní (či sú reverzibilné alebo nie),

— výsledky oftalmologických vyšetrení,

— hematologické testy s významnými základnými hodnotami,

— odkazy senzorickej aktivity, intenzity stlačenia, zovretia a motorickej aktivity (ak sú dostupné),

— konečná telesná hmotnosť, hmotnosť orgánov a pomer hmotnosti orgánov k telesnej hmotnosti,

— pitevné nálezy,

— detailné opisy všetkých histopatologických nálezov,

— absorpčné údaje, ak sú dostupné,

— štatisticky spracované výsledky, ak je to vhodné.

Diskusia o výsledkoch

Závery

▼B

B.28. **ŠTÚDIA SUBCHRONICKEJ DERMÁLNEJ TOXICITY PO 90-DŇOVEJ OPAKOVANEJ KOŽNEJ APLIKÁCII U HLODAVCOV**

1. **METÓDA**

1.1. ÚVOD

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PODSTATA SKÚŠOBNEJ METÓDY

Testovaná látka sa denne nanáša na kožu, v odstupňovaných dávkach niekoľkým skupinám pokusných zvierat, každej skupine jedna úroveň dávky 90 dní. V priebehu obdobia podávania sa zvieratá každý deň pozorujú, aby sa zistili príznaky toxicity. Zvieratá, ktoré počas skúšky uhynuli, a aj zvieratá, ktoré do konca skúšky prežili, sa pitvú.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Neustanovené.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

Príprava

Najmenej päť dní pred testom si zvieratá zvykajú na chovateľské a vyživovacie podmienky, v ktorých budú počas experimentu. Pred testom sa zdravé mladé zvieratá randomizujú a priradia sa k pokusným a kontrolným skupinám. Krátko pred začatím testu sa zvieratám ostrihá srsť na chrbte. Vyholenie srsti je tiež prípustné, malo by sa však uskutočniť asi 24 hodín pred testom. Ostrihanie alebo oholenie je zvyčajne potrebné opakovať približne v týždenných intervaloch. Pri strihaní alebo holení srsti je potrebné dať pozor na to, aby sa neporanila koža. Pre aplikáciu testovanej látky sa pripraví najmenej 10 % povrchu tela. Pri rozhodovaní o veľkosti pripravovanej plochy kože, ktorá má byť zbavená srsti a o veľkosti krycieho obväzu treba vziať do úvahy hmotnosť zvierat. Pri testoch pevných látok, ktoré môžu byť v prípade potreby rozdrvené na prach, sa testovaná látka dostatočne navlhčí vodou, poprípade vhodnou pomocnou látkou, aby bol zaistený dostatočný styk s kožou. Kvapalné testované látky sa spravidla aplikujú neriedené. Aplikácia sa uskutočňuje päť až sedem dní v týždni.

Podmienky testovania

Pokusné zvieratá

Je možné použiť potkana, králika alebo morča. Je možné použiť aj iné živočíšne druhy, ale ich použitie musí byť zdôvodnené. Na začiatku testu by nemali byť odchýlky hmotnosti použitých zvierat viac ako ± 20 % od prispôsobenej strednej priemernej hodnoty. Ak sa uprednostňuje subchronická dermálna štúdia ako predbežná štúdia pred dlhodobou štúdiou, mal by byť v oboch štúdiách použitý rovnaký druh zvierat a rovnaký kmeň.

▼B

Počet a pohlavie

Pre každú pokusnú skupinu by sa malo použiť minimálne 20 zvierat (10 samičiek a 10 samčekov) so zdravou kožou. Samičky nesmú byť ani po vrhu a ani nesmú byť gravidné. Ak majú byť počas testu usmrtené zvieratá, zvýši sa celkový počet zvierat o počet zvierat, ktoré majú byť usmrtené ešte pred koncom testu. Okrem toho sa môže vystaviť aj dodatočná skupina (satelitná skupina) s 20 zvieratami (10 samičiek a 10 samčekov) počas 90 dní najvyššej dávke, aby sa počas 28 dní po vystavení mohla sledovať reverzibilita, pretrvávanie alebo oneskorený prejav toxických účinkov.

Expozičné koncentrácie

Potrebné sú minimálne tri koncentrácie a jedna kontrolná skupina. Odhliadnuc od aplikácie testovanej látky sa zvieratá v kontrolnej skupine musia vystaviť rovnako ako pokusné zvieratá. Ak sa pre uľahčenie dávkovania používa pomocná látka, podáva sa kontrolnej skupine rovnakým spôsobom ako pokusným zvieratám, a to v rovnakom množstve, aké prijme skupina, ktorej sa aplikuje najvyššia dávka. Doba vystavenia by mala byť najmenej šesť hodín denne. Testovaná látka by sa mala aplikovať každý deň približne v rovnakom čase a dávkovanie by malo byť pravidelne (týždenne alebo každých štrnásť dní) prispôsobené, aby bolo konštantné vzhľadom na telesnú hmotnosť zvieraťa. Najvyššia koncentrácia sa volí tak, aby v každom prípade došlo k toxickému účinku, ale aby zvieratá nehynuli alebo iba v malom množstve. Najnižšia koncentrácia by nemala spôsobovať žiadne príznaky toxicity. Ak existujú použiteľné odhady o úrovni vystavenia u človeka, najnižšia dávka by mala túto hodnotu prekročiť. V ideálnom prípade by mala stredná dávka spôsobiť len nízke toxické účinky. Ak sa podávajú viaceré medzikoncentrácie, musia sa voliť tak, aby došlo k postupnej klasifikácii toxických účinkov. V skupinách s nízkou a strednou koncentráciou, ako aj v kontrolných skupinách, by mal byť počet úmrtí nízky, aby sa umožnilo výrazne vyhodnotenie výsledkov.

Ak aplikácia testovanej látky smeruje k závažnému podráždeniu kože, je potrebné znížiť dávku, čo u vysokej koncentrácie môže viesť k obmedzeniu alebo eliminácii iných toxických účinkov. Ak už došlo k závažnému poškodeniu kože, je potrebné test ukončiť a uskutočniť ho znova s nižšími koncentráciami.

Limitný test

Ak predbežná štúdia pri koncentrácii 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti za deň alebo pri vyššej koncentrácii zodpovedajúcej prispôsobenej vystaveniu u človeka, ak je táto známa, nevyvolá žiadne toxické účinky, nie je ďalšie testovanie nutné.

Doba pozorovania

Zvieratá sa pozorujú denne a zaznamenávajú sa prejavy toxicity, včítane času úmrtia a času, v ktorom sa objavili a znova odzneli toxické účinky.

▼B

Postup

Zvieratá sa chovajú jednotlivo v klietkach. Testovaná látka sa v ideálnom prípade zvieratám podáva sedem dní v týždni po dobu 90 dní.

Zvieratá satelitnej skupiny, ktoré sú určené na dodatočné pozorovanie, by nemali byť ďalších 28 dní vystavené, aby sa dala zistiť reverzibilita toxických účinkov alebo pretrvávanie toxických účinkov. Doba vystavenia by mala byť najmenej šesť hodín denne.

Testovaná látka sa nanesie rovnomerne na plochu, ktorá sa rovná asi 10 % celkového povrchu tela. V prípade vysokotoxických látok môže byť táto plocha menšia, no mala by sa však pokryť čo najväčší časť tejto plochy čo najslabšou a naj rovnomernejšou vrstvou.

Počas vystavenia sa testovaná látka udržuje v styku s kožou pomocou porézneho mulového obväzu a nedráždivej náplasti. Testovaná plocha sa ďalej vhodným spôsobom prekryje, aby sa mulový obväz a testovaná látka fixovali a aby zvieratá testovanú látku nepožili. K zamedzeniu požitia látky je možné použiť aj prostriedky pre obmedzenie voľnosti pohybu, celkové znehybnenie sa však neodporúča.

Po uplynutí doby vystavenia sa odstránia zvyšky testovanej látky, pokiaľ možno vodou alebo iným vhodným spôsobom očistenia kože.

Všetky zvieratá sa pozorujú denne a zaznamenávajú sa prejavy toxicity, vrátane času nástupu, závažnosti a trvania. Pozorovanie v klietke zahŕňa zmeny kože, srsti, očí, sliznic, dýchacieho systému a krvného obehu, zmeny funkcie autonómnej a centrálnej nervovej sústavy, somatomotoriky a správania. Meranie spotreby potravy a hmotnosti zvierat sa uskutočňuje týždenne. Je nutné zaistiť pravidelnú kontrolu zvierat, aby pokiaľ možno počas testu nedochádzalo k stratám zvierat, napr. v dôsledku kanibalizmu, autolýzy tkanív alebo chybou pri premiestňovaní zvierat. Po ukončení fázy vystavenia sa všetky zvieratá, ktoré prežili, s výnimkou zvierat satelitnej skupiny, pitvú. Zvieratá, ktoré sú pred smrťou, by sa mali vytriediť, humánne usmrtiť a pitvať.

U všetkých zvierat, včítane kontrolných, sa zvyčajne uskutočňujú nasledujúce vyšetrenia:

a) Oftalmologické vyšetrenie pomocou oftalmoskopom alebo rovnakého vhodného prístroja by sa malo vykonať pred vystavením testovanej látke a na konci štúdie, najlepšie u všetkých zvierat, aspoň však v skupine s najvyššou dávkou a v kontrolnej skupine. Ak sa na konci testu zistia zmeny na očiach, vyšetria sa všetky zvieratá.

b) Na konci testu sa musia vykonať hematologické vyšetrenia, ktoré majú zahŕňať hodnotu hematokrytu, koncentráciu hemoglobínu, počet erytrocytov, leukocytov, diferenciálny obraz, hemokoagulačné parametre ako testy zrážania krvi, zmeria sa napríklad čas zrážania, protrombínový čas, tromboplastínový čas alebo počet trombocytov.

▼B

c) Na konci testu by sa mali vykonať biochemické analýzy krvi. Pre tieto štúdie je vhodné analyzovať koncentráciu elektrolytov, metabolizmus glycidov, funkciu pečene a ľadvín. Výber špecifických testov bude odvodený z pozorovania spôsobu účinku látky. Navrhované vyšetrenia zahŕňajú stanovenie vápniku, fosforu, chloridov, sodíku, draslíku, glukózy na lačno (s pôstnou periodou určenou pre druh zvierať a), hladiny sérovej glutamát-pyruvát transaminázy ([1]), glutamátoxalacetáttransaminázy ([2]), ornitíndekarboxylázy, gamaglutamyltranspeptidázy, dusíku močoviny, albumínu, kreatinínu, celkového bilirubínu a celkových sérových bielkovín. Medzi ďalšie stanovenia, ktoré môžu byť nevyhnutné pre správne toxikologické hodnotenie, patrí stanovenie lipidov, hormónov, rovnováhy kyselín a zásad, methemoglobínu a aktivity cholinesterázy. Dodatočné biochemické analýzy môžu byť použité, ak je nevyhnutné prehĺbenie vyšetrenia pozorovaných toxických účinkov.

d) Analýza moču nie je spravidla potrebná, potrebná je vtedy, ak sa očakáva alebo pozoruje toxický účinok.

Ak údaje z predošlých testov boli nepreukázané, mal by sa brať ohľad na hematologické a biochemické parametre ešte pred začiatkom testu.

Autopsia

U všetkých zvierat zúčastňujúcich sa na teste sa musí vykonať kompletná autopsia skladajúca sa z vonkajšej prehliadky povrchu tela, všetkých telesných otvorov, lebečnej, hrudnej a brušnej dutiny, včítane ich obsahu. Pečeň, obličky, nadobličky a semenníky sa musia čo najskôr po sekcii odvážiť vlhké, aby sa predišlo vysušeniu. Nasledujúce orgány a tkanivá je nutné uchovať vo vhodnom médiu pre prípadné neskoršie histopatologické vyšetrenia: všetky orgány s makroskopickými zmenami, mozog – vrátane medula/pons, kôry malého a veľkého mozgu, hypofýza, štítna žľaza/prištitna žľaza, všetky týmusové tkanivá, (priedušnice), pľúca, srdce, aorta, slinné žľazy, pečeň, slezina, obličky, nadobličky, pankreas, gonády, maternica, akcesórne pohlavné orgány, žlčník (ak je prítomný), ezofagus, žalúdok, dvanástnik, jejunum, ileum, caecum, kolon, rektum, močový mechúr, reprezentatívne lymfatické uzliny, (samičie prsné žľazy), (svalstvo stehna), nervy periférneho systému, (oči), (hrudná kosť s kostnou dreňou), (femur včítane povrchu kĺbu), (miecha v troch úrovniach – oblasť krku, toraxu a bedier) a (extraorbitálna slzná žľaza). Tkanivá uvedené v zátvorkách sa vyšetrujú iba v prípade, ak je možné na ich postihnutie usudzovať na základe príznakov toxicity alebo pokiaľ súvisia s cieľovým orgánom.

Histopatologické vyšetrenie

a) Kompletné histopatologické vyšetrenie normálnej a exponovanej kože, orgánov a tkanív sa uskutoční u všetkých zvierat kontrolnej skupiny a u zvierat skupiny, ktorým bola aplikovaná najvyššia dávka.

b) Vyšetria sa všetky orgány s makroskopickými zmenami.

([1]) V súčasnosti známa ako sérová alanín aminotransferáza.
([2]) V súčasnosti známa ako sérová aspartát aminotransferáza.

▼B

c) Vyšetria sa cieľové orgány zvierat ostatných dávkových skupín.

d) Ak sa použijú potkany, pľúca zvierat v skupinách s nízkou a strednou koncentráciou sa histopatologicky vyšetria k zisteniu príznakov infekcie, aby to umožnilo vhodné posúdenie zdravotného stavu zvierat. Uváži sa vhodnosť histopatologického vyšetrenia pečene a obličiek u zvierat týchto skupín. Ďalšie histopatologické vyšetrenie sa u zvierat týchto skupín nesmie uskutočňovať rutinne, musí sa však uskutočniť vždy na orgánoch, na ktorých boli zistené zmeny v skupine s najvyššou koncentráciou.

e) U zvierat satelitnej skupiny sa musia histopatologicky vyšetriť tie tkanivá a orgány, ktoré vo vystavených skupinách reagujú na testovanú látku.

2. **ÚDAJE**

Údaje by sa mali zhrnúť do tabuľky, pričom sa uvedie u každej pokusnej skupiny počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat so zmenami, druh zmien, ako aj percento zvierat pre každý druh zmeny. Výsledky sa vyhodnotia vhodným štatistickým postupom. Môže byť použitá akákoľvek uznávaná štatistická metóda.

3. **SPRÁVA**

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu obsahuje, pokiaľ možno, tieto informácie:

— živočíšny druh, kmeň, pôvod, chovateľské podmienky, krmivo,

— podmienky testu,

— expozičné koncentrácie (včítane pomocnej látky, ak je použitá) a koncentrácie,

— údaje o toxických reakciách podľa pohlavia a dávky,

— koncentrácie bez účinku, pokiaľ je možné ju stanoviť,

— čas úmrtia počas experimentu, prípadne údaj o prežití zvierat do konca testu,

— opis toxických alebo iných účinkov,

— čas, keď boli pozorované jednotlivé abnormálne príznaky a ich ďalší vývoj,

— údaje o spotrebe potravy a o telesnej hmotnosti,

— oftalmologické nálezy,

— uskutočnené hematologické vyšetrenia a ich výsledky,

— uskutočnené biochemické vyšetrenia a ich výsledky (včítane výsledkov prípadných analýz moču),

— sekčné nálezy,

▼B

— podrobný opis všetkých histopatologických nálezov,

— štatistické vyhodnotenie výsledkov tam, kde je to možné,

— diskusia k výsledkom,

— vyhodnotenie výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **LITERATÚRA**

Pozri všeobecný úvod časť B.

▼M4

B.29. **SUBCHRONICKÁ INHALAČNÁ TOXICITA: 90-DŇOVÁ ŠTÚDIA**

ZHRNUTIE

Táto revidovaná testovacia metóda B.29 bola vypracovaná s cieľom dôkladne opísať inhalačnú toxicitu testovanej chemikálie počas subchronického trvania (90 dní) a poskytnúť podrobné údaje pre kvantitatívne hodnotenie inhalačného rizika. Skupiny desiatich samcov a desiatich samíc hlodavcov sú na šesť hodín denne počas 90 dní (13 týždňov) exponované a) testovanej chemikálii pri troch alebo viacerých úrovniach koncentrácie, b) filtrovanému vzduchu (negatívna kontrola) a/alebo c) nosiču (kontrola pomocou nosiča). Zvieratá sú zvyčajne exponované päť dní v týždni, ale je povolená aj expozícia na sedem dní v týždni. Testujú sa vždy samce aj samice, môžu však byť vystavované rôznym úrovniam koncentrácie, ak je známe, že jedno z pohlaví je voči danej testovanej chemikálii vnímavejšie. Táto metóda poskytuje vedúcemu štúdie flexibilitu, aby mohol zahrnúť satelitné skupiny (reverzibilita), priebežné utratenie, bronchoalveolárnu laváž (BAL), neurologické testy a doplnkové hodnotenia klinickej patológie a histopatologické hodnotenia s cieľom dôkladnejšie charakterizovať toxicitu testovanej chemikálie.

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s Usmerneniami OECD na vykonávanie testov TG 413 (2009). Pôvodné Usmernenia na vykonávanie testov subchronickej inhalačnej toxicity 413 (TG 413) boli prijaté v roku 1981 (1). Táto testovacia metóda B.29 [ako rovnocenná verzia revidovaných usmernení TG 413 (2009)] bola aktualizovaná, aby odrážala stav vedy a spĺňala súčasné a budúce regulačné potreby.

2. Štúdie subchronickej inhalačnej toxicity sa primárne využívajú na odvodenie regulačných koncentrácií pre hodnotenie rizík pre pracovníkov v prostredí pracoviska. Používajú sa aj na hodnotenie rizík súvisiacich s bývaním ľudí, ich prepravou a životným prostredím. Táto metóda umožňuje opísať nepriaznivé účinky po opakovanej dennej inhalačnej expozícii testovanej chemikálii počas 90 dní (približne 10 % dĺžky života potkana). Údaje odvodené zo štúdií subchronickej inhalačnej toxicity možno použiť pri kvantitatívnom hodnotení rizík a pri výbere koncentrácií pre chronické štúdie. Táto testovacia metóda nie je špecificky určená na testovanie nanomateriálov. Vymedzenie pojmov použitých v súvislosti s touto testovacou metódou je uvedené na konci tejto kapitoly a v usmerňovacom dokumente (GD) 39 (2).

ÚVODNÉ ÚVAHY

3. Pred samotným vykonaním štúdie testovacie laboratórium zváži všetky dostupné informácie o testovanej chemikálii s cieľom zlepšiť kvalitu štúdie a minimalizovať využívanie zvierat. Informácie, ktoré pomôžu pri výbere vhodných testovacích koncentrácií, zahŕňajú identitu, chemickú štruktúru a fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej chemikálie; výsledky všetkých testov toxicity *in vitro* alebo *in vivo*; predpokladané použitie (použitia) a potenciál pre expozíciu ľudí; dostupné údaje (Q)SAR, toxikologické údaje o štrukturálne príbuzných látkach a údaje odvodené z iných štúdií opakovanej expozície. Ak sa očakávajú alebo ak sa v priebehu štúdie objavia príznaky neurotoxicity, vedúci štúdie môže rozhodnúť o zahrnutí vhodných hodnotení, ako je napríklad funkčná pozorovacia batéria (FOB) a meranie motorickej aktivity. Aj keď je pri určitých testoch rozhodujúce načasovanie expozícií, tieto dodatočné činnosti nesmú narušiť základný plán štúdie.

▼M4

4. Riedenie žieravých alebo dráždivých testovaných chemikálií sa môže testovať pri koncentráciách, ktoré budú vykazovať želanú mieru toxicity. Bližšie informácie sú k dispozícii v dokumente GD 39 (2). Pri vystavovaní zvierat pôsobeniu týchto materiálov musia byť cieľové koncentrácie dostatočne nízke, aby nespôsobovali výraznú bolesť ani utrpenie, a zároveň dostatočné na predĺženie krivky závislosti reakcie od koncentrácie na úroveň, na ktorej sa zabezpečí regulačný a vedecký cieľ testu. Tieto koncentrácie by sa mali vybrať v závislosti od jednotlivých prípadov, pokiaľ možno podľa vhodne navrhnutej štúdie na zistenie rozsahu, ktorá poskytuje informácie o kritickom parametri, každom prahu dráždivosti a čase nástupu príznakov (pozri odseky 11 – 13). Je potrebné zdôvodniť výber koncentrácie.

5. Moribundné zvieratá alebo zvieratá, ktoré majú očividne silné bolesti alebo vykazujú pretrvávajúce príznaky silného utrpenia, by sa mali humánnym spôsobom usmrtiť. Moribundné zvieratá sa posudzujú rovnako ako zvieratá, ktoré uhynú počas testovania. Kritériá na rozhodnutie usmrtiť moribundné alebo silne trpiace zvieratá a usmernenie o uznaní predvídateľnej alebo nastávajúcej smrti sú predmetom usmerňovacieho dokumentu OECD o humánnych parametroch (Humane Endpoints Guidance Document) (3).

OPIS METÓDY

Výber druhov zvierat

6. Používajú sa zdravé mladé dospelé hlodavce bežne používaných laboratórnych kmeňov. Preferovaným druhom je potkan. Použitie iných druhov je potrebné zdôvodniť.

Príprava zvierat

7. Používajú sa samice, ktoré nikdy nevrhli mláďatá a sú negravidné. V deň randomizácie majú byť zvieratá mladé dospelé jedince vo veku sedem až deväť týždňov. Telesná hmotnosť má byť v rozsahu ± 20 % priemernej hmotnosti každého pohlavia. Zvieratá sú náhodne vybraté, označené tak, aby sa umožnila jednotlivá identifikácia, a držia sa v klietkach aspoň päť dní pred začiatkom testu, aby sa im umožnila aklimatizácia na laboratórne podmienky.

Chov zvierat

8. Zvieratá musia byť jednotlivo identifikované, najlepšie pomocou podkožných transpondérov, aby sa zjednodušilo pozorovanie a zamedzilo zámenám. Teplota miestnosti, kde sa pokusné zviera chová, by mala byť 22 ± 3 °C. Relatívna vlhkosť by sa v ideálnom prípade mala udržiavať v rozsahu od 30 do 70 %, hoci to nemusí byť možné, ak sa ako nosič používa voda. Pred a po expozícii sú zvieratá zvyčajne umiestnené v klietkach v skupinách podľa pohlavia a koncentrácie, ale počet zvierat v jednej klietke by nemal prekážať bezproblémovému pozorovaniu každého zvieraťa, pričom by sa mali minimalizovať straty súvisiace so vzájomným požieraním alebo bojom jedincov. V prípade, že sa použije iba expozícia oblasti nosa, môže byť potrebné, aby sa zvieratá aklimatizovali na skúmavky obmedzujúce pohyb. Obmedzujúce skúmavky by nemali zvieratám spôsobovať neprimeraný stres súvisiaci s fyzikálnymi vlastnosťami, teplotou alebo obmedzením pohybu. Obmedzenie môže mať vplyv na fyziologické sledované parametre, ako sú telesná teplota (hypertermia) a/alebo respiračný minútový objem. Ak sú k dispozícii všeobecné údaje, podľa ktorých k takýmto zmenám nedochádza vo veľkej miere, potom skúmavky nie je potrebné vopred prispôsobiť. Zvieratá vystavené účinkom aerosólu celým telom by sa mali v priebehu expozície umiestniť samostatne, aby sa zabránilo filtrovaniu testovaného aerosólu cez srsť ostatných zvierat v klietke. S výnimkou času trvania expozície sa na kŕmenie môže používať bežné a osvedčené laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou miestnej pitnej vody. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy.

▼M4

Inhalačné komory

9. Pri výbere inhalačnej komory by sa mal vziať do úvahy charakter testovanej chemikálie a predmet testu. Uprednostňuje sa expozícia oblasti nosa (pričom tento pojem zahŕňa expozíciu hlavy, nosa alebo pysku). Vo všeobecnosti sa pri štúdiách kvapalných alebo tuhých aerosólov a pár, ktoré môžu kondenzovať a vytvárať aerosóly, uprednostňuje expozícia oblasti nosa. Špeciálne ciele štúdie možno lepšie dosiahnuť použitím expozície celého tela, ale tento krok je potrebné v správe o štúdii odôvodniť. Na zabezpečenie stability prostredia pri používaní komory na expozíciu celého tela by celkový objem testovaných zvierat nemal presiahnuť 5 % objemu komory. Princípy metód expozície celého tela a oblasti nosa a ich konkrétne výhody a nevýhody sú opísané v dokumente GD 39 (2).

ŠTÚDIE TOXICITY

Limitné koncentrácie

10. Na rozdiel od štúdií akútnej toxicity nie sú pre štúdie subchronickej inhalačnej toxicity stanovené žiadne limitné koncentrácie. Pri maximálnej testovanej koncentrácii je potrebné zvážiť: 1. maximálnu dosiahnuteľnú koncentráciu; 2. najhorší možný prípad úrovne expozície ľudí; 3. potrebu zachovať primeraný prísun kyslíka a/alebo 4. otázky týkajúce sa dobrých životných podmienok zvierat. V prípade chýbajúcich limitov založených na údajoch sa môžu použiť akútne limity podľa nariadenia (ES) č. 1272/2008 (13) (t. j. až do maximálnej koncentrácie 5 mg/l v prípade aerosólov, 20 mg/l v prípade pár a 20 000 ppm v prípade plynov); pozri dokument GD 39 (2). Ak je nutné prekročiť tieto limity pri testovaní plynov alebo vysokoprchavých testovaných chemikálií (napr. chladiace látky), je potrebné uviesť odôvodnenie. Z limitnej koncentrácie by sa mala vyvodiť jednoznačná toxicita bez toho, aby sa zvieratám spôsoboval neprimeraný stres alebo aby bola ovplyvnená dĺžka ich života (3).

Štúdia na zistenie rozsahu

11. Pred začiatkom základnej štúdie je zvyčajne potrebné vykonať štúdiu na zistenie rozsahu. Štúdia na zistenie rozsahu je komplexnejšia ako predbežná štúdia, lebo sa neobmedzuje na výber koncentrácie. Poznatky získané zo štúdie na zistenie rozsahu môžu viesť k úspešnej základnej štúdii. Štúdia na zistenie rozsahu môže napríklad poskytnúť technické informácie o analytických metódach, rozdelení veľkosti častíc, odhalení toxických mechanizmov, klinickej patológii a histopatologických údajoch a odhadoch koncentrácií NOAEL a MTC v základnej štúdii. Vedúci štúdie sa môže rozhodnúť pre štúdiu na zistenie rozsahu s cieľom identifikovať prah dráždivosti dýchacích ciest (napr. histopatológiou dýchacích ciest, testovaním fungovania pľúc alebo bronchoalveolárnou lavážou), hornú koncentráciu tolerovanú bez toho, aby spôsobovala zvieratám neprimeraný stres, a parametre, ktoré najlepšie charakterizujú toxicitu testovanej chemikálie.

12. Štúdia na zistenie rozsahu môže pozostávať z jednej alebo viacerých úrovní koncentrácie. V závislosti od zvolených parametrov sa každej úrovni koncentrácie vystaví tri až šesť samcov a tri až šesť samíc. Štúdia na zistenie rozsahu by mala trvať minimálne päť dní a zvyčajne nie viac ako 28 dní. V správe o štúdii sa uvedú dôvody výberu koncentrácií pre základnú štúdiu. Cieľom základnej štúdie je preukázať vzťah koncentrácie a reakcie založený na parametri, ktorý je podľa očakávaní najcitlivejší. Nízka koncentrácia by mala ideálne predstavovať hladinu bez pozorovaného nepriaznivého účinku, zatiaľ čo z vysokej koncentrácie by sa mala vyvodiť jednoznačná toxicita bez toho, aby sa zvieratám spôsoboval neprimeraný stres alebo aby bola ovplyvnená dĺžka ich života (3).

▼M4

13. Pri výbere úrovní koncentrácie pre štúdiu na zistenie rozsahu je potrebné zvážiť všetky dostupné informácie vrátane vzťahov štruktúry a aktivity a údajov o podobných látkach (pozri odsek 3). Štúdia na zistenie rozsahu môže potvrdiť/vyvrátiť parametre, ktoré sa považujú za najcitlivejšie mechanisticky založené parametre, napr. cholínesterázna inhibícia prostredníctvom organofosfátov, tvorba methemoglobínu prostredníctvom erytrocytotoxických činiteľov, hormóny štítnej žľazy (T_3, T_4) v prípade látok toxických pre štítnu žľazu, proteín, LDH alebo neutrofily pri bronchoalveolárnej laváži v prípade neškodných slabo rozpustných častíc alebo aerosólov dráždivých pre pľúca.

Základná štúdia

14. Základná štúdia subchronickej toxicity vo všeobecnosti pozostáva z troch úrovní koncentrácie a podľa potreby aj zo súbežných negatívnych (vzduchových) kontrol a/alebo kontrol nosiča (pozri odsek 18). Pri výbere vhodných úrovní expozície je potrebné použiť všetky dostupné údaje vrátane výsledkov štúdií systémovej toxicity, metabolizmu a kinetiky (osobitne treba dbať na to, aby sa nepoužívali vysoké úrovne koncentrácie, ktoré nasycujú kinetické procesy). Každá testovacia skupina je zložená z desiatich samcov a desiatich samíc hlodavcov, ktoré sú exponované testovanej chemikálii šesť hodín denne päť dní v týždni počas 13 týždňov (celkové trvanie štúdie 90 dní). Zvieratá môžu byť pôsobeniu chemikálie vystavené aj sedem dní v týždni (napr. pri testovaní inhalovaných liekov). Ak je jedno z pohlaví vnímavejšie na testovanú chemikáliu, môžu byť obe pohlavia vystavené rôznym úrovniam koncentrácie, aby sa optimalizovala reakcia na koncentráciu podľa opisu v odseku 15. Ak sa v prípade iných hlodavcov ako potkanov použije expozícia oblasti nosa, maximálne trvanie expozície je možné prispôsobiť s cieľom minimalizovať druhovo špecifické utrpenie. Pri použití intervalu expozície v trvaní menej ako šesť hodín denne alebo ak je potrebné vykonať štúdiu expozície celého tela s dlhým intervalom (napr. 22 hodín denne), treba uviesť odôvodnenie (pozri dokument GD 39) (2). Počas trvania expozície by sa zviera nemalo kŕmiť, ak expozícia nepresiahne šesť hodín. V priebehu expozície celého tela sa zvieraťu môže podať voda.

15. Pomocou vybratých cieľových koncentrácií by sa mal identifikovať cieľový orgán (orgány) a preukázať zrejmá reakcia na koncentráciu:

— vysoká úroveň koncentrácie by mala mať za následok toxické účinky, ale nemala by spôsobiť pretrvávajúce príznaky ani letalitu, ktoré by znemožnili zmysluplné hodnotenie,

— stredná úroveň (úrovne) koncentrácie by sa mala podávať v takých odstupoch, aby viedla k stupňovaniu toxických účinkov medzi dávkami nízkej a vysokej koncentrácie,

— nízka úroveň koncentrácie by mala vyvolať malé alebo žiadne príznaky toxicity.

Priebežné utratenie

16. Ak sa plánuje priebežné utrácanie zvierat, počet zvierat pri každej úrovni expozície by sa mal zvýšiť o počet, ktorý sa má utratiť pred dokončením štúdie. Priebežné utrácanie zvierat treba odôvodniť, pričom tento postup by mal byť náležite podložený štatistickými analýzami.

▼M4

Satelitná štúdia (štúdia reverzibility)

17. Satelitná štúdia (štúdia reverzibility) sa môže použiť na pozorovanie reverzibility, pretrvávania alebo oneskoreného výskytu toxicity počas primerane dlhého obdobia po skončení testovania, najmenej však počas 14 dní. Satelitné skupiny (reverzibility) pozostávajú z desiatich samcov a desiatich samíc, ktoré sú exponované súbežne s pokusnými zvieratami v základnej štúdii. Skupiny satelitnej štúdie (reverzibility) sú vystavené pôsobeniu testovanej chemikálie pri najvyššej úrovni koncentrácie a súbežne sa podľa potreby vykonávajú vzduchové kontroly a/alebo kontroly nosiča (pozri odsek 18).

Kontrolné zvieratá

18. S kontrolnými zvieratami súbežných negatívnych (vzduchových) kontrol sa zaobchádza rovnako ako so zvieratami testovacej skupiny s tou výnimkou, že sú vystavené filtrovanému vzduchu a nie testovanej chemikálii. Ak sa pri vytváraní testovacieho ovzdušia používa voda alebo iná látka, do štúdie je potrebné namiesto negatívnej (vzduchovej) kontrolnej skupiny zahrnúť kontrolnú skupinu nosiča. Vždy, keď je to možné, sa ako nosič použije voda. Ak sa ako nosič použije voda, kontrolné zvieratá by mali byť exponované vzduchu s rovnakou relatívnou vlhkosťou ako skupiny exponované testovanej chemikálii. Výber vhodného nosiča by mal byť založený na riadne vykonanej predbežnej štúdii alebo na historických údajoch. Ak nie je toxicita nosiča dostatočne známa, vedúci štúdie sa môže rozhodnúť použiť negatívnu (vzduchovú) kontrolu aj kontrolu nosiča, ale tento postup sa vyslovene neodporúča. Ak z predchádzajúcich údajov vyplýva, že nosič nie je toxický, negatívna (vzduchová) kontrolná skupina nie je potrebná a mala by sa použiť iba kontrola nosiča. Ak sa pri predbežnej štúdii testovanej chemikálie pripravenej v nosiči nezistí žiadna toxicita, znamená to, že nosič pri testovanej koncentrácii nie je toxický a táto kontrola nosiča by sa mala použiť.

PODMIENKY EXPOZÍCIE

Podávanie koncentrácií

19. Zvieratá sú vystavené pôsobeniu testovanej chemikálie vo forme plynu, pary, aerosólu alebo ich kombinácie. Fyzikálne skupenstvo, ktoré sa testuje, závisí od fyzikálno-chemických vlastností testovanej chemikálie, zvolených koncentrácií a/alebo najpravdepodobnejšej fyzikálnej formy pri manipulácii a používaní testovanej chemikálie. Hygroskopické a chemicky reaktívne testované chemikálie by sa mali testovať v podmienkach suchého vzduchu. Treba dbať na to, aby sa nevytvorili výbušné koncentrácie. Tuhé materiály môžu byť podrobené mechanickým procesom na zmenšenie veľkosti častíc. Ďalšie usmernenia sa nachádzajú v dokumente GD 39 (2).

Rozdelenie veľkosti častíc

20. Častice by sa mali rozdeliť podľa veľkosti v prípade všetkých aerosólov a pár, ktoré môžu kondenzovať a vytvárať aerosóly. Na umožnenie expozície všetkých relevantných oblastí dýchacej sústavy sa odporúčajú aerosóly so stredným aerodynamickým hmotnostným priemerom (MMAD) v rozsahu od 1 do 3 μm so štandardnou odchýlkou geometrického priemeru (σ_g) v rozsahu od 1,5 do 3,0 (4). Hoci by sa malo vynaložiť primerané úsilie na dodržanie tejto normy, pokiaľ túto podmienku nie je možné splniť, treba predložiť odborný posudok. Napríklad v prípade kovových dymov budú častice menšie, ako stanovuje táto norma, a nabité častice a vlákna môžu túto normu prekračovať.

▼M4

Príprava testovanej chemikálie v nosiči

21. V ideálnom prípade sa testovaná chemikália testuje bez nosiča. Ak je nevyhnutné použiť nosič, aby sa dosiahla vhodná koncentrácia a veľkosť častíc testovanej chemikálie, uprednostňuje sa voda. Vždy, keď je testovaná chemikália rozpustená v nosiči, je potrebné preukázať jej stabilitu.

MONITOROVANIE PODMIENOK EXPOZÍCIE

Prúdenie vzduchu v komore

22. Prúdenie vzduchu cez expozičnú komoru by sa počas každej expozície malo dôkladne kontrolovať, nepretržite monitorovať a zaznamenávať aspoň raz za hodinu. Monitorovanie koncentrácie testovacieho ovzdušia v reálnom čase (alebo dočasnej stability) je integrálne meranie všetkých dynamických parametrov a poskytuje nepriamy prostriedok kontroly všetkých relevantných dynamických inhalačných parametrov. Ak sa koncentrácia monitoruje v reálnom čase, frekvencia meraní prúdenia vzduchu sa môže obmedziť na jedno meranie na expozíciu za deň. Je potrebné venovať osobitnú pozornosť tomu, aby v komorách na expozíciu oblasti nosa nedochádzalo k opätovnému vdychovaniu. Koncentrácia kyslíka by mala byť minimálne 19 % a koncentrácia oxidu uhličitého by nemala presiahnuť 1 %. Ak existuje dôvod domnievať sa, že túto normu nie je možné splniť, koncentrácie kyslíka a oxidu uhličitého by sa mali zmerať. Ak merania v prvý deň expozície preukážu, že úrovne týchto plynov sú správne, ďalšie merania nie sú nutné.

Teplota komory a relatívna vlhkosť

23. Teplotu v komore je potrebné udržiavať na úrovni 22 ± 3 °C. Relatívnu vlhkosť v dýchacej zóne zvierat pri expozícii oblasti nosa aj pri expozícii celého tela je potrebné počas každej expozície nepretržite monitorovať a podľa možnosti raz za hodinu zaznamenávať. Relatívna vlhkosť by sa podľa možnosti mala udržiavať v rozsahu od 30 do 70 %, ale môže sa stať, že táto hodnota bude nedosiahnuteľná (napr. v prípade testovania zmesí na báze vody) alebo nemerateľná z dôvodu interferencie testovanej chemikálie a testovacej metódy.

Testovaná chemikália: nominálna koncentrácia

24. Vždy, keď je to možné, by sa mala vypočítať a zaznamenať nominálna koncentrácia expozície v komore. Nominálna koncentrácia je hmotnosť vytvorenej testovanej chemikálie vydelená celkovým objemom vzduchu, ktorý prešiel systémom inhalačnej komory. Nominálna koncentrácia sa nepoužíva na charakterizáciu expozície zvierat, ale porovnanie nominálnej a skutočnej koncentrácie vypovedá o účinnosti vytvárania testovacieho systému, a teda sa môže použiť na zistenie problémov s tvorbou.

Testovaná chemikália: skutočná koncentrácia

25. Skutočná koncentrácia je koncentrácia testovanej chemikálie odobratej z dýchacej zóny zvierat v inhalačnej komore. Skutočné koncentrácie možno získať špecifickými metódami (napr. priamym odberom vzorky, adsorpčnými alebo chemicky reaktívnymi metódami a následnou analytickou charakterizáciou) alebo nešpecifickými metódami, ako je gravimetrická filtrová analýza. Použitie gravimetrickej analýzy je prípustné iba v prípade jednozložkových práškových aerosólov alebo aerosólov kvapalín s nízkou prchavosťou, pričom je potrebné túto analýzu podložiť primeranými testovými charakterizáciami predbežných štúdií týkajúcich sa konkrétnej chemikálie. Koncentráciu viaczložkových práškových aerosólov

▼M4

takisto možno stanoviť prostredníctvom gravimetrickej analýzy. V tom prípade sú však potrebné analytické údaje, ktoré preukazujú, že zloženie materiálu vo vzduchu je podobné ako zloženie východiskového materiálu. Ak tieto informácie nie sú dostupné, môže byť potrebná opätovná analýza testovanej chemikálie (ideálne v jej skupenstve v ovzduší) v pravidelných intervaloch v priebehu štúdie. V prípade aerosólových látok, ktoré sa môžu vypariť alebo môžu sublimovať, by sa malo preukázať, že všetky fázy sa zhromaždili pomocou zvolenej metódy.

26. Ak je to možné, počas celej štúdie by sa mala použiť jedna dávka testovanej chemikálie, pričom testovaná vzorka by sa mala uskladniť za podmienok, za ktorých sa zachová jej čistota, homogenita a stabilita. Pred začatím štúdie by mala byť k dispozícii charakterizácia testovanej chemikálie vrátane jej čistoty a, ak je to technicky možné, identity a množstiev identifikovaných kontaminantov a prímesí. Charakterizáciu možno preukázať napríklad týmito údajmi: retenčný čas a relatívna plocha píku, molekulová hmotnosť získaná pomocou analýzy hmotnostnej spektrometrie alebo plynovej chromatografie alebo iné odhady. Hoci za identitu testovanej vzorky testovacie laboratórium nenesie zodpovednosť, je vhodné, aby testovacie laboratórium aspoň čiastočne potvrdilo charakterizáciu poskytnutú dodávateľom (napr. farbu, fyzikálne skupenstvo atď.).

27. Podľa možnosti je potrebné udržiavať ovzdušie pri expozícii konštantné. Na preukázanie stability podmienok expozície sa môže použiť zariadenie na monitorovanie v reálnom čase, ako napríklad aerosólový fotometer pre aerosóly alebo komplexný uhľovodíkový analyzátor pre pary. Skutočná koncentrácia v komore by sa mala merať aspoň tri razy v každý deň expozície a pri každej úrovni expozície. Ak to pre nízky prietok vzduchu alebo nízke koncentrácie nie je možné, je prijateľný jeden odber vzorky počas intervalu expozície. V takom prípade by sa mala táto vzorka podľa možnosti odoberať za celé trvanie expozície. Jednotlivé vzorky koncentrácie v komore by sa nemali od strednej koncentrácie v komore odchýliť o viac ako ± 10 % v prípade plynov a pár a o viac ako ± 20 % v prípade kvapalných alebo tuhých aerosólov. Čas na dosiahnutie rovnováhy v komore (t_{95}) by sa mal vypočítať a zaznamenať. Interval expozície zahŕňa čas, keď sa testovaná chemikália tvorí. Zohľadňuje sa pri tom čas potrebný na dosiahnutie rovnováhy v komore (t_{95}) a čas rozpadu. Usmernenia k odhadovaniu t_{95} sú uvedené v dokumente GD 39 (2).

28. V prípade veľmi komplexných zmesí tvorených plynmi/parami a aerosólov (napr. spaľovacieho ovzdušia a testovaných chemikálií poháňaných účelovými výrobkami/zariadeniami koncového použitia) sa v inhalačnej komore môže každá fáza správať inak. Preto by sa pre každú fázu (plyn/para a aerosól) mala vybrať aspoň jedna látka slúžiaca ako ukazovateľ (analyt), obyčajne hlavná aktívna zložka v zmesi. Ak je testovaná chemikália zmes, v správe by sa mala uviesť analytická koncentrácia celej zmesi, nielen aktívnej látky alebo látky slúžiacej ako ukazovateľ (analyt). Ďalšie informácie týkajúce sa skutočných koncentrácií sú uvedené v dokumente GD 39 (2).

Testovaná chemikália: rozdelenie veľkosti častíc

29. Rozdelenie veľkosti častíc aerosólov by sa pri každej úrovni koncentrácie malo stanoviť aspoň raz za týždeň, a to pomocou kaskádového impaktora alebo alternatívneho prístroja, ako je napríklad aerodynamický spektrometer častíc (APS). Ak možno preukázať rovnocennosť výsledkov získaných pomocou kaskádového impaktora a alternatívneho prístroja, potom sa alternatívny prístroj môže používať počas celej štúdie.

▼M4

30. Druhé zariadenie, ako je gravimetrický filter alebo impinger/premývačka, by sa malo použiť súbežne s hlavným prístrojom na potvrdenie zachytávacej účinnosti hlavného prístroja. Hmotnostná koncentrácia získaná analýzou veľkosti častíc by mala byť v rozsahu primeraných limitov hmotnostnej koncentrácie získanej filtrovou analýzou [pozri dokument GD 39 (2)]. Ak možno preukázať rovnocennosť pri všetkých koncentráciách testovaných v počiatočnej fáze štúdie, nie je potrebné vykonávať ďalšie potvrdzujúce merania. V záujme zabezpečenia dobrých životných podmienok pre zvieratá by sa mali prijať opatrenia na minimalizáciu nejednoznačných údajov, ktoré môžu viesť k potrebe opakovať štúdiu.

31. Rozdelenie veľkosti častíc by sa malo vykonať v prípade pár, ak existuje možnosť, že kondenzácia pary môže mať za následok tvorbu aerosólu, alebo ak sa v ovzduší pár zistia častice s potenciálom zmiešaných fáz.

POZOROVANIA

32. Zvieratá by sa mali pred, počas a po skončení expozície klinicky pozorovať. V závislosti od reakcie zvierat počas expozície môžu byť potrebné častejšie pozorovania. Ak pozorovaniu zvierat bráni používanie skúmaviek obmedzujúcich pohyb zvierat, slabo osvetlených komôr na expozíciu celého tela alebo nepriehľadné ovzdušie, zvieratá by sa mali dôkladne preskúmať po skončení expozície. Na základe pozorovaní pred expozíciou v nasledujúcom dni možno zhodnotiť akúkoľvek reverzibilitu alebo zhoršenie toxických účinkov.

33. Všetky pozorovania sa zaznamenávajú, pričom každé zviera má individuálny záznam. Keď sa zvieratá usmrtia z humánnych dôvodov alebo sa nájdu uhynuté, je potrebné čo možno najpresnejšie zaznamenať čas uhynutia.

34. Pozorovania v klietkach sa zameriavajú na zmeny kože a srsti, očí, sliznic, dýchania a krvného obehu, zmeny nervového systému a zmeny somatomotoriky a správania. Pozornosť sa zameriava na pozorovanie triašky, kŕčov, slinenia, hnačky, letargie, spánku a kómy. Meraním rektálnej teploty možno získať dôkazy svedčiace o reflexnej bradypney alebo hypo/hypertermii, ktoré súvisia s testovaním alebo s obmedzením pohybu. Protokol o štúdii môže zahŕňať ďalšie hodnotenia, ako je napríklad kinetika, biomonitorovanie, funkcia pľúc, zadržiavanie slabo rozpustných materiálov, ktoré sa hromadia v pľúcnom tkanive, a zmeny správania.

TELESNÉ HMOTNOSTI

35. Hmotnosť jednotlivých zvierat je potrebné zaznamenať krátko pred prvou expozíciou (deň 0), potom dvakrát týždenne (napríklad: piatky a pondelky, aby sa preukázalo zotavenie po víkende bez expozícií, alebo v časovom intervale, ktorý umožňuje hodnotenie systémovej toxicity) a v čase uhynutia alebo utratenia. Ak sa v prvých štyroch týždňoch neobjavia žiadne účinky, po zvyšok štúdie sa môže telesná hmotnosť merať raz za týždeň. Satelitné zvieratá (na štúdiu reverzibility, ak sa použijú) sa naďalej vážia raz za týždeň počas celého obdobia zotavovania. Na konci štúdie by sa všetky zvieratá mali krátko pred utratením odvážiť, aby sa získali neskreslené vypočítané pomery hmotnosti orgánov k telu.

SPOTREBA POTRAVY A VODY

36. Spotreba potravy by sa mala merať raz za týždeň. Môže sa merať aj spotreba vody.

▼M4

KLINICKÁ PATOLÓGIA

37. Hodnotenia klinickej patológie sa po utratení vykonávajú pri všetkých zvieratách vrátane kontrolných a satelitných zvierat (na štúdiu reverzibility). Je potrebné zaznamenať časový interval medzi skončením expozície a odberom krvi, najmä ak je rekonštitúcia sledovaného parametra rýchla. Odber vzoriek po skončení expozície je indikovaný pri tých parametroch, ktoré majú krátky biologický polčas v plazme (napr. COHb, CHE a MetHb).

38. V tabuľke 1 sa uvádza zoznam parametrov klinickej patológie, ktoré sa vo všeobecnosti požadujú pri všetkých toxikologických štúdiách. Rozbor moču sa bežne nevyžaduje, ale môže sa vykonať, ak sa na základe očakávanej alebo pozorovanej toxicity predpokladá, že bude užitočný. Vedúci štúdie sa môže rozhodnúť hodnotiť ďalšie parametre s cieľom lepšie charakterizovať toxicitu testovanej chemikálie (napr. cholínesteráza, lipidy, hormóny, acidobázická rovnováha, methemoglobín alebo Heinzove telieska, kreatinkináza, pomer myelocytov a erytrocytov, troponíny, plyny v arteriálnej krvi, laktátdehydrogenáza, sorbitol-dehydrogenáza, glutamat-dehydrogenáza a gama-glutamyl transpeptidáza).

Tabuľka 1

Štandardné parametre klinickej patológie

Hematológia	
Počet erytrocytov	Celkový počet leukocytov
Hematokrit	Diferenciálny počet leukocytov
Koncentrácia hemoglobínu	Počet trombocytov
Stredný korpuskulárny hemoglobín	Potenciál zrážania krvi (vyberte jednu z možností):
Stredný korpuskulárny objem	— Protrombínový čas
Koncentrácia stredného korpuskulárneho hemoglobínu	— Čas zrážania krvi
Retikulocyty	— Čiastočný tromboplastínový čas

Klinická chémia	
Glukóza (*)	Alanín-amintransferáza
Celkový cholesterol	Aspartát-aminotransferáza
Triglyceridy	Alkalická fosfatáza
Dusík z močoviny v krvi	Draslík
Celkový bilirubín	Sodík
Kreatinín	Vápnik
Celkový obsah bielkovín	Fosfor
Albumíny	Chloridy
Globulíny	

Rozbor moču (nepovinné)	
Vzhľad (farba a zakalenie)	Celkový obsah bielkovín
Objem	Glukóza
Špecifická hmotnosť alebo osmolalita	Krv/krvinky
pH	

(*) Keďže dlhé obdobie bez kŕmenia môže pri pokusných zvieratách v porovnaní s kontrolnými zvieratami viesť k skresleniu meraní glukózy, vedúci štúdie by mal určiť, či je primerané, aby sa zvieratá nekŕmili. Ak sa použije obdobie bez kŕmenia, malo by byť primerané použitému živočíšnemu druhu; pri potkanoch to môže byť 16 hodín (nočný pôst). Stanovenie glukózy nalačno sa môže vykonať po nočnom pôste počas posledného týždňa expozície alebo po nočnom pôste pred pitvou (v druhom prípade spolu so všetkými ostatnými parametrami klinickej patológie).

▼**M4**

39. Ak existuje dôkaz, že hlavným miestom usadzovania a zachytávania sú dolné dýchacie cesty (t. j. alveoly), ako metóda kvantitatívnej analýzy hypotetických parametrov účinnosti dávky zameranej na hypersenzitívnu pneumonitídu, zápal pľúc a fosfolipidózu sa môže zvoliť bronchoalveolárna laváž (BAL). Tá umožňuje primerane preskúmať priebežné zmeny alveolárneho poškodenia súvisiace so závislosťou reakcie od dávky. Z tekutiny bronchoalveolárnej laváže sa môže analyzovať celkový a diferenciálny počet leukocytov, celkový obsah bielkovín a laktát-dehydrogenáza. Ďalej sa môžu zvážiť parametre indikujúce lyzozomálne poškodenie, fosfolipidózu, fibrózu a dráždivé alebo alergické zápaly, ktoré môžu zahŕňať stanovenie zápalových cytokínov/chemokínov. Merania BAL vo všeobecnosti dopĺňajú výsledky histopatologických testov, nemôžu ich však nahradiť. Usmernenia o postupe pľúcnej laváže sú uvedené v dokumente GD 39 (2).

OFTALMOLOGICKÉ VYŠETRENIE

40. Pomocou oftalmoskopu alebo podobného vhodného zariadenia sa vykoná oftalmologické vyšetrenie očného pozadia, refrakčného systému oka, dúhovky a spojoviek pri všetkých zvieratách pred podaním testovanej chemikálie a po skončení expozície pri všetkých skupinách s vysokými koncentráciami a pri kontrolných skupinách. Ak sa zistia zmeny na oku, vyšetria sa všetky zvieratá v ostatných skupinách vrátane satelitnej skupiny (reverzibilita).

MAKROSKOPICKÁ PATOLÓGIA A ORGÁNOVÉ HMOTNOSTI

41. Všetky testované zvieratá vrátane tých, ktoré uhynú počas testu alebo sa vylúčia zo štúdie z dôvodu starostlivosti o zvieratá, sa podrobujú úplnému vykrveniu (ak je uskutočniteľné) a makroskopickej autopsii. Pri každom zvierati sa zaznamená čas medzi skončením poslednej expozície a utratením. Ak nie je možné vykonať autopsiu ihneď po objavení uhynutého zvieraťa, zviera sa schladí (nie zmrazí) na dostatočne nízku teplotu, aby sa minimalizovala autolýza. Autopsie by sa mali vykonať čo najskôr, zvyčajne v priebehu jedného alebo dvoch dní. Pri každom zvierati sa zaznamenajú všetky makroskopické patologické zmeny, pričom osobitná pozornosť sa venuje akýmkoľvek zmenám v dýchacej sústave.

42. V tabuľke 2 sa uvádza zoznam orgánov a tkanív, ktoré je počas makroskopickej pitvy potrebné zachovať vo vhodnom médiu na účely histopatologického vyšetrenia. O uchovaní orgánov a tkanív [v zátvorke] a všetkých ostatných orgánov a tkanív rozhodne vedúci štúdie. Orgány vyznačené **tučným písmom** by sa mali čo najskôr po disekcii upraviť a odvážiť v mokrom stave, aby sa zabránilo ich vyschnutiu. Štítna žľaza a nadsemenníky by sa mali vážiť iba v prípade potreby, lebo úprava artefaktov môže brániť histopatologickému hodnoteniu. Tkanivá a všetky orgány sa fixujú v 10 % formalínovom tlmivom roztoku alebo v inom vhodnom fixačnom prostriedku ihneď po vykonaní autopsie a nie skôr ako 24 – 48 hodín pred úpravou v závislosti od použitého fixačného prostriedku.

▼M4

Tabuľka 2

Orgány a tkanivá zachované počas makroskopickej pitvy

Nadobličky	Pažerák
Srdcovnica	[Čuchový bulbus]
Kostná dreň (a/alebo čerstvý aspirát)	**Vaječníky**
Mozog (vrátane častí predného mozgu, mozočka a predĺženej miechy/mosta)	Pankreas
Slepé črevo	Prištítne telieska
Hrubé črevo	Periférny nerv (sedací alebo tibiálny, podľa možnosti blízko svalu)
Dvanástnik	Hypofýza
[**Nadsemenníky**]	Prostata
[Oči (sietnica, očný nerv) a očné viečka]	Rektum
Stehnová kosť a kolenný kĺb	Slinné žľazy
Žlčník	Semenné mechúriky
[Harderove žľazy]	Koža
Srdce	Miecha (krčná, hrudná a lumbálna)
Ileum	**Slezina**
Lačník	Hrudná kosť
Obličky	Žalúdok
[Slzné žľazy (extraorbitálne)]	Zuby
Hrtan (tri úrovne vrátane základne epiglotis)	**Semenníky**
Pečeň	**Týmus**
Pľúca (všetky laloky na jednej úrovni vrátane hlavných priedušiek)	**Štítna žľaza**
Lymfatické uzliny z hilovej oblasti pľúc, najmä v prípade tuhých testovaných chemikálií so slabou rozpustnosťou. Pri detailnejších testoch a/alebo štúdiách s imunologickým zameraním sa môžu zvážiť ďalšie lymfatické uzliny, napr. z mediastinálnych, cervikálnych/submandibulárnych a/alebo aurikulárnych oblastí.	[Jazyk]
	Priedušnica (najmenej dve úrovne vrátane jedného pozdĺžneho rezu cez karinu a jedného priečneho rezu)
Lymfatické uzliny (distálne od brány vstupu)	Močovod
Prsná žľaza (samičia)	Močová rúra
Sval (stehenný)	Močový mechúr
Nosohltanové tkanivá (aspoň štyri úrovne; jedna úroveň zahŕňa nosohltanovú trubicu a nosové lymfoidné tkanivo (NALT))	**Maternica**
	Cieľové orgány
	Všetky makroskopické poškodenia a hmotnosti

▼M4

43. Pľúca by sa mali odňať neporušené, odvážiť a napustiť vhodným fixačným prostriedkom pri tlaku 20 – 30 cm vody, aby sa zachovala ich štruktúra (5). Je potrebné odobrať rezy všetkých lalokov na jednej úrovni vrátane hlavných priedušiek, ale ak sa robí pľúcna laváž, mali by sa vykonať rezy nelavážovaného laloku na troch úrovniach (nie sériové rezy).

44. Preskúmajú sa najmenej štyri úrovne nosohltanových tkanív, z ktorých jedna by mala obsahovať nosohltanovú trubicu (5) (6) (7) (8) (9), aby sa umožnilo vhodné preskúmanie dlaždicového, prechodného (neriasinkového dýchacieho), dýchacieho (riasinkového dýchacieho) a čuchového epitelu a odvodného lymfatického tkaniva (NALT) (10) (11). Preskúmajú sa tri úrovne hrtana, pričom jedna z týchto úrovní by mala obsahovať základňu epiglotis (12). Je potrebné preskúmať aspoň dve úrovne priedušnice vrátane jedného pozdĺžneho rezu cez karinu bifurkácie extrapulmonárnych priedušiek a jedného priečneho rezu.

HISTOPATOLÓGIA

45. Pri kontrolných skupinách a skupinách s vysokými koncentráciami a pri všetkých zvieratách, ktoré uhynú alebo sú utratené počas štúdie, sa vykoná histopatológia všetkých orgánov a tkanív vymenovaných v tabuľke 2. Osobitná pozornosť by sa mala venovať dýchacím cestám, cieľovým orgánom a makroskopickým poškodeniam. Orgány a tkanivá, ktoré majú poškodenia v skupine s vysokými koncentráciami, sa preskúmajú pri všetkých skupinách. Vedúci štúdie sa môže rozhodnúť pre vykonanie histopatologických hodnotení pri ďalších skupinách s cieľom preukázať jednoznačnú reakciu na koncentráciu. Ak boli použité satelitné skupiny (reverzibilita), histopatologické hodnotenie sa vykoná v prípade všetkých tkanív a orgánov, pri ktorých boli v testovaných skupinách zistené účinky. Ak v skupine s vysokou expozíciou došlo k nadmernému predčasnému úhynu alebo iným problémom, ktoré spochybňujú významnosť údajov, je potrebné histopatologicky preskúmať najbližšiu nižšiu koncentráciu. Sledovanie nálezov pitvy by malo korelovať s mikroskopickými nálezmi.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

46. Je potrebné uviesť údaje o telesnej hmotnosti, spotrebe potravy, klinickej patológii, makroskopickej patológii, orgánových hmotnostiach a histopatológii jednotlivých zvierat. Údaje z klinických pozorovaní sa zhrnú v podobe tabuliek, kde sa uvedie pre každú pokusnú skupinu počet použitých zvierat, počet zvierat vykazujúcich špecifické príznaky toxicity, počet zvierat, ktoré sa našli uhynuté počas testu alebo ich usmrtili z humánnych dôvodov, čas uhynutia jednotlivých zvierat, opis a časový priebeh toxických účinkov a reverzibility a pitevné nálezy. Všetky výsledky, kvantitatívne aj náhodné, sa vyhodnotia primeranou štatistickou metódou. Možno použiť akúkoľvek všeobecne akceptovanú štatistickú metódu, pričom štatistické metódy je potrebné vybrať počas plánovania štúdie.

Správa o teste

47. Správa o teste by mala podľa potreby obsahovať tieto informácie:

Testované zvieratá a chov:

— opis podmienok v klietkach vrátane: počtu (alebo zmeny počtu) zvierat na klietku, výstelky, teploty prostredia a relatívnej vlhkosti, dĺžky svetlej fázy a identifikácie krmiva,

▼M4

— použité druhy/kmene a odôvodnenie použitia druhov iných ako potkany, môže sa uviesť zdroj a historické údaje, ak sa týkajú zvierat v podobných podmienkach expozície, umiestnenia a kŕmenia,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— metóda randomizácie,

— opis akýchkoľvek podmienok pred testovaním vrátane krmiva, karantény a liečby chorôb.

Testovaná chemická látka:

— fyzikálny charakter, čistota a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti (vrátane izomerizácie),

— identifikačné údaje a registračné číslo CAS (Chemical Abstract Services), ak je známe.

Nosič:

— odôvodnenie použitia nosiča a odôvodnenie výberu nosiča (ak je iný ako voda),

— historické alebo súčasné údaje preukazujúce, že nosič nemá vplyv na výsledky štúdie.

Inhalačná komora:

— podrobný opis inhalačnej komory vrátane objemu a nákresu,

— zdroj a opis zariadenia použitého na expozíciu zvierat, ako aj na vytvorenie ovzdušia,

— zariadenie na meranie teploty, vlhkosti, veľkosti častíc a skutočnej koncentrácie,

— zdroj vzduchu a použitý klimatizačný systém,

— metódy použité na kalibráciu zariadenia s cieľom zabezpečiť homogénne testovacie ovzdušie,

— rozdiel tlakov (pozitívny alebo negatívny),

— expozičné otvory na jednu komoru (v prípade expozície oblasti nosa), umiestnenie zvierat v komore (v prípade expozície celého tela),

— stabilita testovacieho ovzdušia,

— umiestnenie senzorov teploty a vlhkosti a odber vzorky testovacieho ovzdušia v komore,

— manipulácia s privádzaným/extrahovaným vzduchom,

— hodnoty prietoku vzduchu, prietok vzduchu na jeden expozičný otvor (v prípade expozície oblasti nosa) alebo množstvo zvierat na komoru (v prípade expozície celého tela),

— čas potrebný na dosiahnutie rovnováhy v inhalačnej komore (t95),

— počet zmien objemu za hodinu,

— meracie prístroje (ak sa použili).

Údaje o expozícii:

— odôvodnenie výberu cieľovej koncentrácie pre základnú štúdiu,

▼M4

— nominálne koncentrácie (celková hmotnosť testovanej chemikálie aplikovanej do inhalačnej komory vydelená objemom vzduchu, ktorý prešiel komorou),

— skutočné koncentrácie testovanej chemikálie zachytenej z dýchacej zóny zvierat, v prípade zmesí, ktoré vytvárajú heterogénne fyzikálne skupenstvá (plyny, pary, aerosóly) možno každé skupenstvo analyzovať samostatne,

— všetky koncentrácie vzduchu sa udávajú v hmotnostných jednotkách (mg/l mg/m^3 atď.), nie v objemových jednotkách (ppm, ppb atď.),

— rozdelenie veľkosti častíc, stredný aerodynamický hmotnostný priemer (MMAD) a štandardná odchýlka geometrického priemeru (σ_g) vrátane metód ich výpočtu. Jednotlivé analýzy veľkosti častíc sa uvedú v správe.

Podmienky testovania:

— podrobné informácie o príprave testovanej chemikálie vrátane podrobných údajov o všetkých postupoch použitých na zmenšenie veľkosti častíc tuhých materiálov alebo na prípravu roztokov testovanej chemikálie,

— opis (podľa možnosti spolu s nákresom) zariadenia použitého na vytvorenie testovacieho ovzdušia a na expozíciu zvierat testovaciemu ovzdušiu,

— podrobné informácie o zariadeniach použitých na monitorovanie teploty, vlhkosti a prúdenia vzduchu v komore (t. j. vývoj kalibračnej krivky),

— podrobné informácie o zariadeniach použitých pri odbere vzoriek na stanovenie koncentrácie v komore a rozdelenia veľkosti častíc,

— podrobné informácie o použitej chemickej analytickej metóde a o overení metódy (vrátane účinnosti výťažnosti testovanej chemikálie z prostriedku na odber vzorky),

— metóda randomizácie pri prideľovaní zvierat do testovacích a kontrolných skupín,

— údaje o kvalite krmiva a vody (vrátane druhu/zdroja krmiva, zdroja vody),

— odôvodnenie výberu testovacích koncentrácií.

Výsledky:

— tabuľkové spracovanie teploty, vlhkosti a prúdenia vzduchu v komore,

— tabuľkové spracovanie údajov o nominálnych a skutočných koncentráciách,

— tabuľkové spracovanie údajov o veľkosti častíc vrátane údajov o odbere vzoriek na analýzu, o rozdelení veľkosti častíc a o výpočtoch MMAD a σ_g,

— tabuľkové spracovanie získaných údajov o reakcii a úrovni koncentrácie pre každé zviera (t. j. zvieratá vykazujúce príznaky toxicity vrátane mortality, charakteru, závažnosti, času nástupu a trvania účinkov),

▼M4

— tabuľkové spracovanie hmotností jednotlivých zvierat,

— tabuľkové spracovanie spotreby potravy,

— tabuľkové spracovanie údajov klinickej patológie,

— pitevné nálezy a histopatologické nálezy pre každé zviera, ak sú k dispozícii.

Rozbor a interpretácia výsledkov:

— osobitný dôraz sa kladie na opis metód použitých na splnenie kritérií tejto testovacej metódy, napr. limitnej koncentrácie alebo veľkosti častíc,

— dýchateľnosť častíc vzhľadom na celkové zistenia sa uvedie, najmä ak nebolo možné splniť kritériá na veľkosť častíc,

— konzistencia metód použitých na stanovenie nominálnej a skutočnej koncentrácie a vzťah skutočnej koncentrácie k nominálnej koncentrácii sa uvedú v celkovom hodnotení štúdie,

— uvedie sa pravdepodobná príčina uhynutia a prevládajúci druh pôsobenia (systémové či lokálne),

— uvedie sa vysvetlenie, ak bolo potrebné humánnym spôsobom utratiť zvieratá, ktoré mali bolesti alebo vykazovali príznaky silného alebo pretrvávajúceho utrpenia, v súlade s kritériami v usmerňovacom dokumente OECD o humánnych parametroch (Guidance Document on Humane Endpoints) (3),

— identifikuje sa cieľový orgán (orgány),

— stanoví sa NOAEL a LOAEL.

LITERATÚRA

1. OECD (1981). *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*, Original Test Guideline No 413, Environment Directorate, OECD, Paríž.

2. OECD (2009). *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing,* Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paríž.

3. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paríž.

4. Whalan, J. E., a Redden, J. C. (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.

5. Dungworth, D. L., Tyler, W. S., Plopper, C. E. (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in *Toxicology of Inhaled Material*, Witschi, H. P., a Brain, J. D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, s. 229 – 258.

6. Young, J. T. (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309 – 312.

7. Harkema, J. R. (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231 – 238.

▼**M4**

8. Woutersen, R. A., Garderen-Hoetmer, A., van Slootweg, P. J., Feron, V. J. (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes, M. P., a Ward, J. M. (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, s. 215 – 263.

9. Mery, S., Gross, E. A., Joyner, D. R., Godo, M., Morgan, K. T. (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. Toxicol. Pathol. 22: 353 – 372.

10. Kuper, C. F., Koornstra, P. J., Hameleers, D. M. H., Biewenga, J., Spit, B. J., Duijvestijn, A. M., Breda Vriesman van, P. J. C., Sminia, T. (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. Immunol. Today 13: 219 –224.

11. Kuper, C. F., Arts, J. H. E., Feron, V. J. (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. Toxicol. Lett. 140 – 141: 281 – 285.

12. Lewis, D. J. (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. Journal of Anatomy 132(3): 419 – 428.

13. Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006 (Ú. v. EÚ L 353, 31.12.2008, s. 1).

▼**M4**

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMU

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

▼M4

B.30. ŠTÚDIE CHRONICKEJ TOXICITY

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s Usmerneniami OECD na vykonávanie testov (TG) 452 (2009). Pôvodné usmernenia TG 452 boli prijaté v roku 1981. Vypracovanie tejto revidovanej testovacej metódy B.30 sa považovalo za potrebné na zohľadnenie najnovšieho vývoja v oblasti starostlivosti o zvieratá a regulačných požiadaviek (1) (2) (3) (4). Aktualizácia tejto testovacej metódy B.30 bola vykonaná súbežne s revíziou kapitoly B.32 tejto prílohy, Štúdie karcinogenity, a kapitoly B.33 tejto prílohy, Kombinované štúdie chronickej toxicity/karcinogenity, s cieľom získať ďalšie informácie pomocou zvierat použitých v štúdii a poskytnúť ďalšie podrobné údaje o výbere dávky. Táto testovacia metóda je vypracovaná pre testovanie širokej škály chemikálií vrátane pesticídov a priemyselných chemikálií.

2. Väčšina štúdií chronickej toxicity sa vykonáva na hlodavcoch a táto testovacia metóda sa preto primárne vzťahuje na štúdie vykonávané na týchto živočíšnych druhoch. Ak sa takéto štúdie budú vyžadovať v prípade nehlodavcov, takisto sa s príslušnými úpravami môžu uplatniť princípy a postupy uvedené v tejto testovacej metóde spolu s princípmi a postupmi uvedenými v kapitole B.27 tejto prílohy, 90-dňová štúdia orálnej toxicity pri nehlodavcoch v opakovaných dávkach (5), ako sa uvádza v Usmerňovacom dokumente OECD č. 116 o príprave a vykonávaní štúdií chronickej toxicity a karcinogenity (6).

3. Tri hlavné spôsoby podávania používané v štúdiách chronickej toxicity sú orálne, dermálne a inhalačné podávanie. Výber spôsobu podávania závisí od fyzikálnych a chemických vlastností testovanej chemikálie a najčastejšieho spôsobu expozície u človeka. Ďalšie informácie o výbere spôsobu expozície sú uvedené v usmerňovacom dokumente OECD č. 116 (6).

4. Táto testovacia metóda je zameraná na orálnu expozíciu, ktorá sa v štúdiách chronickej toxicity používa najčastejšie. Hoci dlhodobé štúdie chronickej toxicity využívajúce dermálnu alebo inhalačnú expozíciu môžu byť takisto potrebné na hodnotenie zdravotných rizík pre človeka a/alebo sa môžu vyžadovať v určitých regulačných režimoch, oba spôsoby expozície sú do značnej miery technicky zložité. Takéto štúdie budú musieť byť pripravené v závislosti od jednotlivých prípadov, hoci testovacia metóda, ktorá sa tu uvádza na posúdenie a vyhodnotenie chronickej toxicity pri orálnom podávaní, by mohla slúžiť ako základ protokolu pre inhalačné a/alebo dermálne štúdie vzhľadom na odporúčania týkajúce sa období testovania, klinických a patologických parametrov atď. K dispozícii sú usmernenia OECD o podávaní testovaných chemikálií inhalačným (6) (7) a dermálnym spôsobom (6). Pri príprave dlhodobejších štúdií zahŕňajúcich inhalačnú expozíciu je nutné si preštudovať najmä kapitolu B.8 tejto prílohy (8) a kapitolu B.29 tejto prílohy (9) spolu s Usmerňovacím dokumentom OECD o testovaní akútnej inhalačnej toxicity (7). Kapitolu B.9 tejto prílohy (10) je nutné konzultovať v prípade testovania dermálnej expozície.

▼**M4**

5. Štúdia chronickej toxicity poskytuje informácie o možnej nebezpečnosti pre zdravie, ktorá sa pravdepodobne vyskytne pri opakovanej expozícii v priebehu významnej časti dĺžky života použitého živočíšneho druhu. Štúdia poskytne informácie o toxických účinkoch testovanej chemikálie, indikuje cieľové orgány a možnosť akumulácie. Môže takisto zabezpečiť odhad hladiny bez pozorovaného nepriaznivého účinku, ktorý možno použiť na stanovenie bezpečnostných kritérií týkajúcich sa expozície človeka. Takisto sa v nej zdôrazňuje nutnosť dôkladných klinických pozorovaní zvierat s cieľom získať čo najväčšie množstvo informácií.

6. Medzi ciele štúdie v rámci tejto testovacej metódy patrí:

— identifikácia chronickej toxicity testovanej chemikálie,

— identifikácia cieľových orgánov,

— charakterizácia vzťahu medzi dávkou a reakciou,

— identifikácia hladiny bez pozorovaného nepriaznivého účinku (NOAEL) alebo východiska na stanovenie porovnávacej dávky (BMD),

— predpovedanie účinkov chronickej toxicity na úrovniach expozície človeka,

— poskytnutie údajov na testovanie hypotéz týkajúcich sa druhu pôsobenia (6).

ÚVODNÉ ÚVAHY

7. Pri posudzovaní a vyhodnocovaní toxikologických vlastností testovanej chemikálie testovacie laboratórium pred vykonaním štúdie zváži všetky dostupné informácie o testovanej chemikálii s cieľom zamerať prípravu štúdie na účinnejšie testovanie potenciálu chronickej toxicity a minimalizovať využívanie zvierat. Informácie, ktoré pomôžu pri príprave štúdie, zahŕňajú identitu, chemickú štruktúru a fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej chemikálie, akékoľvek informácie o druhu pôsobenia, výsledky všetkých testov toxicity *in vitro* alebo *in vivo*, predpokladané použitie/použitia a potenciál pre expozíciu ľudí, dostupné údaje (Q)SAR a toxikologické údaje o štrukturálne príbuzných chemikáliách, dostupné toxikokinetické údaje (kinetika pri jednej dávke a takisto pri opakovaných dávkach, ak je k dispozícii) a údaje získané z iných štúdií opakovanej expozície. Stanovenie chronickej toxicity sa vykoná až po získaní prvotných informácií o toxicite z 28-dňového a/alebo 90-dňového testu toxicity v opakovaných dávkach. Stratégiu fázového testovania pri testovaní chronickej toxicity treba zvážiť ako súčasť celkového hodnotenia potenciálnych nepriaznivých zdravotných účinkov danej testovanej chemikálie (11) (12) (13) (14).

8. Štatistické metódy, ktoré sú vzhľadom na prípravu pokusu a ciele na analýzu výsledkov najprimeranejšie, sa stanovia pred začatím štúdie. Je potrebné zvážiť, či by štatistiky nemali zahŕňať úpravu vzhľadom na prežitie zvierat a analýzu v prípade predčasného konca jednej alebo viacerých skupín. Usmernenia o vhodných štatistických analýzach a kľúčové odkazy na medzinárodne uznávané štatistické metódy sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (6), ako aj v Usmerňovacom dokumente č. 35 o analýze a hodnotení štúdií chronickej toxicity a karcinogenity (15).

▼M4

9. Pri vykonávaní štúdie chronickej toxicity je vždy nutné sa riadiť hlavnými zásadami a úvahami uvedenými v Usmerňovacom dokumente OECD č. 19 o rozpoznaní, hodnotení a použití klinických príznakov ako humánnych parametrov pre pokusné zvieratá používané pri hodnotení bezpečnosti (16), najmä v odseku 62. V tomto odseku sa uvádza, že „ak v štúdiách s opakovanými dávkami zviera vykazuje klinické príznaky, ktoré sú progresívne a vedú k ďalšiemu zhoršeniu stavu, je potrebné na základe informácií rozhodnúť, či sa má zviera humánne usmrtiť alebo nie. Pri rozhodovaní treba zvážiť hodnotu informácií, ktoré by sa získali ďalším udržiavaním zvieraťa pri živote v rámci štúdie, v spojitosti s jeho celkovým stavom. Ak sa prijme rozhodnutie, že testovanie zvieraťa bude pokračovať, frekvencia pozorovaní by sa mala podľa potreby zvýšiť. Takisto je možné, bez toho, aby to malo negatívny vplyv na účel testu, dočasne pozastaviť podávanie dávok, ak sa tým zvieraťu uľaví od bolesti alebo utrpenia, alebo znížiť testovaciu dávku.“

10. Podrobné usmernenia a rozbor zásad výberu dávky v štúdiách chronickej toxicity a karcinogenity sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (6), ako aj v dvoch publikáciách Medzinárodného inštitútu prírodných vied (International Life Sciences Institute) (17) (18). Základná stratégia výberu dávky závisí od primárneho cieľa alebo cieľov štúdie (odsek 6). Pri výbere vhodných úrovní dávky je potrebné dosiahnuť rovnováhu medzi skríningom nebezpečnosti na jednej strane a charakterizáciou reakcie na nízke dávky a jej významu na druhej strane. To má význam najmä v prípade kombinovanej štúdie chronickej toxicity a karcinogenity (kapitola B.33 tejto prílohy, odsek 11).

11. Treba zvážiť vykonanie kombinovanej štúdie chronickej toxicity a karcinogenity (kapitola B.33 tejto prílohy) namiesto samostatného vykonania štúdie chronickej toxicity (táto testovacia metóda B.30) a štúdie karcinogenity (kapitola B.32 tejto prílohy). Kombinovaným testom sa zabezpečí vyššia účinnosť, pokiaľ ide o čas a náklady, ako v prípade vykonania dvoch samostatných štúdií bez toho, aby sa znížila kvalita údajov, či už vo fáze chronickej toxicity alebo vo fáze karcinogenity. V prípade kombinovanej štúdie chronickej toxicity a karcinogenity (kapitola B.33 tejto prílohy) však treba náležite zohľadniť zásady výberu dávky (odseky 9 a 20 – 25), pričom sa takisto pripúšťa, že v určitých regulačných rámcoch sa môže vyžadovať vykonanie samostatných štúdií.

12. Vymedzenie pojmov použitých v súvislosti s touto testovacou metódou je uvedené na konci tejto kapitoly a v usmerňovacom dokumente (GD) č. 116 (6).

PRINCÍP TESTU

13. Testovaná chemikália sa podáva denne v odstupňovaných dávkach niekoľkým skupinám pokusných zvierat, zvyčajne počas 12 mesiacov, hoci v závislosti od regulačných požiadaviek možno zvoliť aj dlhšie alebo kratšie obdobia (pozri odsek 33). Vybraté obdobie by malo byť dostatočne dlhé, aby sa mohli prejaviť účinky kumulatívnej toxicity, ale bez toho, aby testovanie zmarili zmeny súvisiace so starnutím zvierat. Odchýlky od 12-mesačného trvania expozície je potrebné odôvodniť, najmä v prípade kratších trvaní. Testovaná chemikália sa zvyčajne podáva orálne, aj keď môže byť vhodné aj testovanie inhalačnej alebo dermálnej expozície. Plán štúdie môže zahŕňať aj jedno alebo viaceré priebežné utratenia, napr. po troch a šiestich mesiacoch, pričom na doplnenie počtu je možné použiť ďalšie skupiny zvierat (pozri odsek 19). Počas tohto obdobia sú na zvieratách dôkladne pozorované prípadné znaky toxicity látok. Pitva sa uskutoční na zvieratách uhynutých alebo usmrtených počas testovania a aj po ukončení testu na zvieratách, ktoré test prežijú.

▼M4

OPIS METÓDY

Výber druhov zvierat

14. Táto testovacia metóda primárne zahŕňa posudzovanie a vyhodnocovanie chronickej toxicity pri hlodavcoch (pozri odsek 2), hoci sa pripúšťa, že v určitých regulačných režimoch sa môžu vyžadovať podobné štúdie pri nehlodavcoch. Výber druhu zvierat je potrebné odôvodniť. Príprava a vykonanie štúdií chronickej toxicity pri nehlodavcoch, ak sa požadujú, by mali byť založené na zásadách uvedených v tejto testovacej metóde, ako aj na zásadách uvedených v kapitole B.27 tejto prílohy, 90-dňová štúdia orálnej toxicity pri nehlodavcoch v opakovaných dávkach (5). Ďalšie informácie o výbere druhov a kmeňa zvierat sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (6).

15. V rámci tejto testovacej metódy je najvhodnejším hlodavcom potkan, hoci sa môžu použiť aj iné hlodavce, napr. myši. Potkany a myši sú uprednostňované pokusné modely vzhľadom na ich pomerne krátku dĺžku života, ich rozsiahle využívanie vo farmakologických a toxikologických štúdiách, ich náchylnosť na indukciu nádoru a dostupnosť dostatočne charakterizovaných kmeňov. Vzhľadom na tieto charakteristiky je k dispozícii veľké množstvo informácií o ich fyziológii a patológii. Používajú sa mladé zdravé dospelé zvieratá bežne používaných laboratórnych kmeňov. Štúdiu chronickej toxicity možno vykonať pri zvieratách z toho istého kmeňa a zdroja, ako sú zvieratá, ktoré sa použili v predbežnej štúdii (štúdiách) toxicity s kratším trvaním. Používajú sa samice, ktoré nikdy nevrhli mláďatá a sú negravidné.

Podmienky umiestnenia a kŕmenia

16. Zvieratá môžu byť umiestnené jednotlivo alebo v malých skupinách rovnakého pohlavia v klietkach. Samostatné umiestnenie by sa malo zvážiť iba v prípade, že je to vedecky opodstatnené (19) (20) (21). Klietky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy vzhľadom na ich umiestnenie. Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 °C (± 3 °C). Hoci relatívna vlhkosť by mala byť najmenej 30 % a prednostne by nemala presiahnuť 70 %, okrem času čistenia miestnosti, cieľom by mala byť 50 – 60 % vlhkosť. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Potrava musí vyhovovať všetkým výživovým požiadavkám pre testované druhy zvierat a obsah kontaminantov potravy vrátane rezíduí pesticídov, perzistentných organických znečisťujúcich látok, fytoestrogénov, ťažkých kovov, mykotoxínov a iných kontaminantov, ktoré môžu mať vplyv na výsledky testu, musí byť čo najnižší. Analytické informácie o úrovni živín a kontaminantov potravy by sa mali získavať priebežne, aspoň na začiatku štúdie a pri zmene používanej šarže, a mali by sa uviesť v záverečnej správe. Podobne treba uviesť analytické informácie o pitnej vode použitej v štúdii. Výber krmiva môže byť ovplyvnený potrebou zabezpečiť vhodnú prímes testovanej chemikálie a potrebou splniť výživové požiadavky pri zvieratách v prípade, že sa testovaná chemikália podáva v potrave.

Príprava zvierat

17. Použijú sa zdravé zvieratá, ktoré sa aklimatizovali na laboratórne podmienky aspoň sedem dní a ktoré sa predtým nepodrobili iným pokusom. V prípade hlodavcov sa musí dávkovanie začať čo najskôr po odstavení mláďat a aklimatizácii a podľa možnosti skôr, než zvieratá dovŕšia vek ôsmich týždňov. Pokusné zvieratá sa charakterizujú na základe druhu, kmeňa, zdroja, pohlavia, hmotnosti a veku. Na začiatku štúdie má byť rozdiel medzi hmotnosťami použitých zvierat z každého pohlavia minimálny a pre každé pohlavie zvlášť nemá presahovať ± 20 % priemernej hmotnosti

▼M4

všetkých zvierat v štúdii. Zvieratá by mali byť postupne zadelené do kontrolných skupín a skupín, ktorým sa podáva látka. Po randomizácii by medzi jednotlivými skupinami v rámci každého pohlavia nemali byť výrazné rozdiely v priemernej telesnej hmotnosti. Ak existujú štatisticky významné rozdiely, randomizácia by sa podľa možnosti mala zopakovať. Každému zvieraťu sa pridelí jedinečné identifikačné číslo, ktorým sa zviera trvalo označí tetovaním, mikročipovým implantátom alebo inou vhodnou metódou.

POSTUP

Počet zvierat a ich pohlavie

18. Použijú sa obe pohlavia. Mal by sa použiť dostatočný počet zvierat, aby bol na konci štúdie v každej skupine k dispozícii dostatok zvierat na dôkladné biologické a štatistické hodnotenie. V prípade hlodavcov sa zvyčajne použije minimálne 20 zvierat z každého pohlavia na skupinu pri každej úrovni dávky, zatiaľ čo pri nehlodavcoch sa odporúča použitie minimálne štyroch zvierat z každého pohlavia na skupinu. V štúdiách, v ktorých sa využívajú myši, môže byť na uskutočnenie všetkých požadovaných hematologických vyšetrení potrebné použiť v každej skupine s dávkou viac zvierat.

Zabezpečenie priebežného utrácania, satelitných skupín a sentinelových zvierat

19. Ak je to vedecky opodstatnené, v štúdii sa môže počítať s priebežným utrácaním (najmenej desať zvierat z každého pohlavia na skupinu), napr. po šiestich mesiacoch, s cieľom získať informácie o progresii toxikologických zmien a mechanistické informácie. Ak už takéto informácie o testovanej chemikálii sú k dispozícii z predchádzajúcich štúdií toxicity v opakovaných dávkach, priebežné utrácanie zvierat nie je vedecky opodstatnené. Takisto je možné použiť satelitné skupiny na monitorovanie reverzibility akýchkoľvek toxikologických zmien vyvolaných skúmanou testovanou chemikáliou. Tieto skupiny sa zvyčajne obmedzujú na najvyššiu úroveň dávky použitej v štúdii a na kontrolu. Na monitorovanie stavu choroby možno počas štúdie v prípade potreby použiť aj ďalšiu skupinu sentinelových zvierat (zvyčajne päť zvierat z každého pohlavia) (22). Ak sa plánuje priebežné utrácanie zvierat alebo použitie satelitných alebo sentinelových skupín, počet zvierat zahrnutých v pláne štúdie by mal byť zvýšený o plánovaný počet zvierat, ktoré majú byť utratené pred ukončením štúdie. Tieto zvieratá sa zvyčajne podrobia tým istým pozorovaniam vrátane pozorovaní telesnej hmotnosti, spotreby potravy/vody, hematologickým meraniam a meraniam klinickej biochémie a patologickým vyšetreniam ako zvieratá vo fáze chronickej toxicity v rámci základnej štúdie, hoci sa takisto môže zabezpečiť, aby sa (v skupinách, v ktorých sa plánuje priebežné utrácanie zvierat) merania obmedzili na špecifické kľúčové ukazovatele, ako je neurotoxicita alebo imunotoxicita.

Skupiny s dávkami a dávkovanie

20. Usmernenia o všetkých aspektoch výberu dávky a odstupoch medzi jednotlivými úrovňami dávok sú uvedené v usmerňovacom dokumente č.116 (6). Použijú sa aspoň tri úrovne dávky a súbežná kontrola s výnimkou prípadov, keď sa vykonáva limitný test (pozri odsek 27). Úroveň dávky zvyčajne vychádza z výsledkov krátkodobých štúdií v opakovaných dávkach alebo štúdií na zistenie rozsahu, pričom je potrebné prihliadať na existujúce toxikologické a toxikokinetické údaje, ktoré sú o testovanej chemikálii alebo príbuzných chemikáliách k dispozícii.

▼M4

21. Pokiaľ to dovoľuje fyzikálno-chemický charakter alebo biologické účinky testovanej chemikálie, na identifikáciu hlavných cieľových orgánov a toxických účinkov by sa mala vybrať najvyššia úroveň dávky, ktorá súčasne nebude mať za následok utrpenie, závažnú toxicitu, morbiditu alebo uhynutie. Pri súčasnom zohľadnení faktorov uvedených v odseku 22 by sa mala vybrať najvyššia úroveň dávky preukazujúca toxicitu, o ktorej svedčí napríklad pokles prírastku telesnej hmotnosti (o približne 10 %).

22. V závislosti od cieľov štúdie (pozri odsek 6) však možno vybrať najvyššiu dávku, ktorá je nižšia ako dávka preukazujúca toxicitu, napr. ak dávka vyvoláva daný nepriaznivý účinok, ktorý má však malý vplyv na dĺžku života alebo na telesnú hmotnosť. Najvyššia dávka by nemala presiahnuť 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň (limitná dávka, pozri odsek 27).

23. Úrovne dávok a odstupy medzi úrovňami dávok možno vybrať s cieľom určiť vzťah medzi dávkou a reakciou a hladinu NOAEL alebo iný plánovaný výsledok štúdie, napr. BMD (pozri odsek 25) pri najnižšej úrovni dávky. Medzi faktory, ktoré by sa mali zvážiť pri podávaní nižších dávok, patrí predpokladaný sklon krivky závislosti reakcie od dávky, dávky, pri ktorých môže dochádzať k významným zmenám v metabolizme, alebo druhu toxického pôsobenia, keď sa očakáva prahová hodnota alebo keď sa očakáva východisko pre extrapoláciu nízkej dávky.

24. Vybraté odstupy medzi úrovňami dávok budú závisieť od vlastností testovanej chemikálie a nemožno ich v rámci tejto testovacej metódy predpísať, ale dobrá účinnosť testov sa často dosahuje, ak sa na stanovenie zostupného dávkovania použijú intervaly dávkovania s faktorom dva až štyri, pričom pridanie štvrtej pokusnej skupiny je často vhodnejšie ako používanie veľmi veľkých intervalov (napr. s faktorom vyšším ako 6 – 10) medzi dávkami. Vo všeobecnosti by sa nemali používať faktory vyššie ako 10 a v prípade, že sa použijú, je nutné tento postup odôvodniť.

25. Ako sa ďalej uvádza v usmerňovacom dokumente č.116 (6), pri výbere dávky je potrebné zvážiť tieto body:

— známe alebo predpokladné nelinearity alebo inflexné body krivky závislosti reakcie od dávky,

— toxikokinetika a rozsahy dávok, pri ktorých dochádza alebo nedochádza k metabolickej indukcii, nasýteniu alebo nelinearite medzi externými a internými dávkami,

— prekurzorné poškodenia, markery účinkov alebo ukazovatele prebiehajúcich kľúčových základných biologických procesov,

— kľúčové (alebo predpokladané) aspekty druhu pôsobenia, ako sú dávky, pri ktorých začína vznikať cytotoxicita, narúšajú sa hormonálne hladiny, preťažujú sa homeostatické mechanizmy atď.,

— oblasti krivky závislosti reakcie od dávky, kde je potrebný veľmi podrobný odhad, napr. v oblasti predpokladanej dávky BMD alebo predpokladanej prahovej úrovne,

— zváženie očakávaných úrovní expozície človeka.

▼M4

26. Kontrolnou skupinou je skupina, ktorá nebola vystavená účinkom chemikálie, alebo skupina, ktorej sa podáva nosič, ak sa pri podávaní testovanej chemikálie používa nosič. So zvieratami v kontrolnej skupine sa musí zaobchádzať takisto ako so zvieratami v testovaných skupinách, s výnimkou aplikovania testovanej chemikálie. Ak sa použije nosič, kontrolná skupina dostane nosič v najvyššom objeme, aký bol použitý pri skupinách s dávkami. Ak sa testovaná chemikália podáva v potrave a vedie k výraznému zníženiu príjmu potravy v dôsledku zvýšeného nechutenstva, môže byť užitočné použiť ďalšiu súčasne kŕmenú kontrolnú skupinu, ktorá poslúži ako vhodnejšia kontrola.

27. Ak na základe informácií z predbežných štúdií možno predpokladať, že test pri jednej úrovni dávky dosahujúcej najmenej 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň s využitím postupov opísaných pre túto štúdiu pravdepodobne nebude mať nepriaznivé účinky a ak sa na základe údajov o štrukturálne príbuzných chemikáliách neočakáva toxicita, potom sa úplná štúdia s využitím troch úrovní dávok nepovažuje za potrebnú. Uplatňuje sa limit 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň s výnimkou prípadu, keď expozícia človeka indikuje potrebu použitia vyššej úrovne dávky.

Príprava dávok a podávanie testovanej chemikálie

28. Testovaná chemikália sa zvyčajne podáva orálne, v potrave alebo pitnej vode alebo cez sondu. Ďalšie informácie o spôsoboch a metódach podávania sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (6). Spôsob a metóda podávania závisí od účelu štúdie, fyzikálnych/chemických vlastností testovanej chemikálie, jej biodostupnosti a prevládajúceho spôsobu a metódy expozície u človeka. Vybratý spôsob a metódu podávania je potrebné odôvodniť. V záujme zabezpečenia dobrých životných podmienok pre zvieratá sa orálna sonda zvyčajne zvolí iba v prípade látok, pri ktorých spôsob a metóda podávania primerane reprezentuje potenciálnu expozíciu u človeka (napr. v prípade liekov). Potravinové alebo environmentálne chemikálie obsahujúce pesticídy sa zvyčajne podávajú v potrave alebo v pitnej vode. V určitých prípadoch, napr. v prípade expozície na pracovisku, však môže byť vhodnejšie podanie iným spôsobom.

29. Ak je to potrebné, testovaná chemikália sa rozpustí alebo suspenduje vo vhodnom nosiči. Náležitá pozornosť by sa mala venovať nasledujúcim vlastnostiam nosiča a ostatným aditívam: vplyv na absorpciu, distribúciu, metabolizmus alebo zadržiavanie testovanej chemikálie, vplyvy na chemické vlastnosti testovanej chemikálie, ktoré môžu zmeniť svoje toxické vlastnosti, vplyv na spotrebu potravy a vody alebo na stav výživy zvierat. Odporúča sa, aby sa vždy, keď je to možné, najskôr zvážilo použitie vodného roztoku/suspenzie, potom roztoku/emulzie v oleji (napr. kukuričný olej) a nakoniec prípadného roztoku v iných nosičoch. Charakteristiky toxicity nosičov iných ako voda musia byť známe. Musia byť k dispozícii informácie o stabilite testovanej chemikálie a homogenite dávkovacích roztokov alebo krmív (podľa potreby) v podmienkach podávania (napr. v potrave).

30. V prípade chemikálií podávaných v potrave alebo pitnej vode je dôležité zabezpečiť, aby množstvá použitej testovanej chemikálie neinterferovali s normálnou výživovou a vodnou bilanciou. V dlhodobých štúdiách toxicity, pri ktorých sa využíva podávanie v potrave, by koncentrácia testovanej chemikálie v krmive zvyčajne nemala presiahnuť horný limit 5 % z celkového množstva krmiva, aby sa zabránilo nutričnej nevyváženosti. Ak je testovaná chemikália podávaná v potrave, môže sa použiť buď konštantná stravná koncentrácia (mg/kg potravy alebo ppm) alebo konštantná úroveň dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť zvieraťa (mg/kg telesnej hmotnosti), ktorá sa vypočíta každý týždeň. Použitú alternatívu je potrebné špecifikovať.

▼M4

31. V prípade orálneho podávania sa zvieratám podávajú dávky testovanej chemikálie denne (sedem dní v týždni), zvyčajne počas 12 mesiacov (pozri aj odsek 33), hoci v závislosti od regulačných požiadaviek sa môže požadovať dlhšie obdobie. Použitie každého iného režimu dávkovania, napr. päť dní v týždni, sa musí odôvodniť. V prípade podávania cez kožu sa zvieratám zvyčajne aplikuje testovaná chemikália najmenej šesť hodín denne, sedem dní v týždni, ako je uvedené v kapitole B.9 tejto prílohy (10), počas 12 mesiacov. Inhalačná expozícia sa vykonáva šesť hodín denne, sedem dní v týždni, ale ak je to odôvodnené, môže sa použiť aj expozícia počas piatich dní v týždni. Obdobie expozície zvyčajne trvá 12 mesiacov. Ak sa v prípade iných hlodavcov ako potkanov použije expozícia oblasti nosa, maximálne trvanie expozície je možné prispôsobiť s cieľom minimalizovať druhovo špecifické utrpenie. Ak sa použije expozícia v trvaní menej ako šesť hodín denne, treba uviesť odôvodnenie. Pozri aj kapitolu B.8 tejto prílohy (8).

32. Ak sa testovaná chemikália zvieratám podáva pomocou sondy, podáva sa prostredníctvom žalúdočnej sondy alebo vhodnej intubačnej kanyly približne v rovnakom čase každý deň. Zvyčajne sa podáva jedna dávka raz za deň. Ak je napríklad chemikália lokálne dráždivá, je možné zachovať dennú dávku tak, že sa rozdelí a podá v dvoch častiach (dvakrát denne). Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže jednorazovo podať, závisí od veľkosti pokusného zvieraťa. Objem by mal byť podľa možnosti čo najnižší a v prípade hlodavcov by zvyčajne nemal presahovať 1 ml/100 g telesnej hmotnosti (22). Zmeny v aplikovanom objeme sa minimalizujú tým, že sa koncentrácie upravia tak, aby sa zabezpečil stály objem vo všetkých dávkach. Výnimkou sú potenciálne žieravé alebo dráždivé chemikálie, ktoré je nutné zriediť, aby sa predišlo závažným lokálnym účinkom. Nemalo by sa testovať pri koncentráciách, ktoré sú pravdepodobne žieravé alebo dráždivé pre gastrointestinálny trakt.

Trvanie štúdie

33. Hoci táto testovacia metóda je primárne navrhnutá ako 12-mesačná štúdia chronickej toxicity, plán štúdie možno použiť aj pri štúdiách s kratším (napr. šesť alebo deväť mesiacov) alebo dlhším trvaním (napr. 18 alebo 24 mesiacov) v závislosti od požiadaviek konkrétnych regulačných režimov alebo špecifických mechanistických účelov. Odchýlky od 12-mesačného trvania expozície je potrebné odôvodniť, najmä v prípade kratších trvaní. Satelitné skupiny zahrnuté s cieľom monitorovať reverzibilitu všetkých toxikologických zmien spôsobených skúmanou testovanou chemikáliou by sa mali zachovať bez dávkovania najmenej počas štyroch týždňov a najviac počas jednej tretiny celkového trvania štúdie po ukončení expozície. Ďalšie usmernenia vrátane úvah o prežití v štúdii sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (6).

POZOROVANIA

34. Pri všetkých zvieratách si treba všímať morbiditu alebo mortalitu, zvyčajne na začiatku a na konci každého dňa vrátane víkendov a sviatkov. Všeobecné klinické pozorovania sa vykonávajú najmenej raz denne, najlepšie každý deň v rovnakom čase, vzhľadom na časový vrchol očakávaných účinkov po dávkovaní v prípade podávania cez sondu.

▼M4

35. Všetky zvieratá sa pred prvou expozíciou najmenej raz podrobia dôkladným klinickým pozorovaniam (aby sa umožnilo porovnávanie jednotlivých zvierat navzájom), potom na konci prvého týždňa štúdie a následne každý mesiac. Protokol o pozorovaniach musí byť pripravený tak, aby sa rozdiely medzi jednotlivými pozorovateľmi minimalizovali a neboli závislé od testovacej skupiny. Tieto pozorovania sa vykonávajú mimo domovskej klietky, radšej v štandardnej aréne a v podobnom čase pri každej príležitosti. Musia byť pozorne zaznamenané, s použitím hodnotiaceho systému explicitne vymedzeného testovacím laboratóriom. Je potrebné minimalizovať odlišnosti v podmienkach pozorovaní. Medzi príznaky, ktoré je potrebné si všímať, patria zmeny na koži, srsti, očiach, sliznici, výskyt sekrécie, exkrécie a vegetatívnej aktivity (slzenie, piloerekcia, veľkosť zreničiek a nezvyčajné dýchanie), ale uvedené príznaky nie sú vyčerpávajúce. Zmeny v chôdzi, držaní tela a reakcii na zaobchádzanie, ako aj prítomnosť kónických alebo napätých pohybov, stereotypov (napr. nadmerné očisťovanie tela, opakované točenie sa) alebo zvláštne správanie (napr. chôdza dozadu, sebaznetvorenie) sa takisto musia zaznamenať (24).

36. Pred prvým podaním testovanej chemikálie sa pri všetkých zvieratách vykoná oftalmologické vyšetrenie pomocou oftalmoskopu alebo iného vhodného zariadenia. Na konci štúdie sa toto vyšetrenie podľa možnosti vykoná pri všetkých zvieratách, ale minimálne pri zvieratách v skupine s vysokou dávkou a zvieratách v kontrolnej skupine. Ak sa po vystavení zvierat účinkom látky zistia zmeny na očiach, musia byť vyšetrené všetky zvieratá. Ak štrukturálna analýza alebo iné informácie indikujú toxicitu očí, potom je potrebné zvýšiť frekvenciu očných vyšetrení.

37. V prípade chemikálií, pri ktorých predchádzajúce 28-dňové a/alebo 90-dňové testy toxicity v opakovaných dávkach indikovali potenciál vyvolať neurotoxické účinky, sa môže nepovinne vykonať určenie zmyslovej reaktivity podnecovanej rôznymi spôsobmi (24) (napr. zvukovými, zrakovými a proprioceptívnymi podnetmi) (25) (26) (27), hodnotenie sily zovretia (28) a hodnotenie motorickej aktivity (29), a to pred začiatkom štúdie a každé tri mesiace po začatí štúdie počas až 12 mesiacov, ako aj pri ukončení štúdie (ak štúdia trvá dlhšie ako 12 mesiacov). Ďalšie podrobnosti o postupoch, ktoré môžu nasledovať, sú uvedené v príslušných odkazoch. Možno však použiť aj iné alternatívne postupy k postupom, ktoré tu boli opísané.

38. V prípade chemikálií, pri ktorých predchádzajúce 28-dňové a/alebo 90-dňové testy toxicity v opakovaných dávkach indikovali potenciál vyvolať imunotoxické účinky, možno nepovinne na konci testu vykonať ďalšie vyšetrenia tohto parametra.

Telesná hmotnosť, spotreba potravy/vody a účinnosť krmiva

39. Všetky zvieratá sa odvážia na začiatku testu, najmenej raz týždenne počas prvých 13 týždňov a následne najmenej raz za mesiac. Spotreba potravy a účinnosť krmiva sa merajú najmenej raz za týždeň počas prvých 13 týždňov a následne najmenej raz za mesiac. Ak sa chemikália podáva vo vode na pitie, spotreba vody sa meria najmenej raz za týždeň počas prvých 13 týždňov a následne najmenej raz za mesiac. Merania spotreby vody by sa mali zvážiť aj v prípade štúdií, pri ktorých sa mení pitný režim.

▼M4

Hematológia a klinická biochémia

40. V štúdiách využívajúcich hlodavce sa hematologické vyšetrenia vykonajú najmenej pri desiatich samcoch a desiatich samiciach v každej skupine, a to po 3, 6 a 12 mesiacoch, a takisto na konci štúdie (ak štúdia trvá dlhšie ako 12 mesiacov), pričom sa vždy použijú tie isté zvieratá. V prípade myší môžu byť na uskutočnenie všetkých požadovaných hematologických vyšetrení potrebné satelitné zvieratá (pozri odsek 18). V prípade štúdií nehlodavcov sa vzorky odoberú menšiemu počtu zvierat (napr. v prípade štúdií psov štyrom zvieratám z každého pohlavia v každej skupine), a to v priebežných časoch na odber vzoriek a na konci štúdie, podobne ako sa uvádza pri štúdiách hlodavcov. Pri hlodavcoch ani nehlodavcoch nie je nutné vykonať merania po troch mesiacoch, ak v predchádzajúcej 90-dňovej štúdii vykonanej pri porovnateľných úrovniach dávok nebol na hematologických parametroch pozorovaný žiadny účinok. Vzorky krvi sa odoberajú v anestézii zo stanoveného miesta, napríklad vpichom do srdca alebo zo zadnej očnicovej dutiny.

41. Je potrebné vyšetriť tieto parametre (30): celkový a diferenciálny počet leukocytov, počet erytrocytov, počet trombocytov, koncentrácia hemoglobínu, hematokrit, stredný objem erytrocytu (MCV), stredná koncentrácia hemoglobínu v erytrocyte (MCH), stredná farebná koncentrácia hemoglobínu (MCHC), protrombínový čas a aktivovaný parciálny tromboplastínový čas. Podľa potreby sa v závislosti od toxicity testovanej chemikálie môžu merať ďalšie hematologické parametre, ako sú Heinzove telieska alebo iná atypická morfológia erytrocytov alebo methemoglobín. Vo všeobecnosti treba zaujať flexibilný postoj v závislosti od pozorovaného a/alebo očakávaného účinku danej testovanej chemikálie. Ak má testovaná chemikália vplyv na hematopoetický systém, môže byť indikovaný aj počet retikulocytov a cytológia kostnej drene, hoci tieto vyšetrenia sa bežne nemusia vykonávať.

42. Klinická biochémia skúma hlavné toxické účinky na tkanivá a najmä účinky na obličky a pečeň. Vyšetrenie sa uskutočňuje zo vzoriek krvi, ktoré sa odoberú aspoň desiatim samcom a desiatim samiciam z každej skupiny v tých istých časových intervaloch, ako je špecifikované pre hematologické vyšetrenia, pričom sa vždy použijú tie isté zvieratá. V prípade myší môžu byť na uskutočnenie všetkých požadovaných vyšetrení klinickej biochémie potrebné satelitné zvieratá. V prípade štúdií nehlodavcov sa vzorky odoberú menšiemu počtu zvierat (napr. v prípade štúdií psov štyrom zvieratám z každého pohlavia v každej skupine), a to v priebežných časoch na odber vzoriek a na konci štúdie, podobne ako sa uvádza pri štúdiách hlodavcov. Pri hlodavcoch ani nehlodavcov nie je nutné vykonať merania po troch mesiacoch, ak v predchádzajúcej 90-dňovej štúdii vykonanej pri porovnateľných úrovniach dávok nebol na parametroch klinickej biochémie pozorovaný žiadny účinok. Odporúča sa, aby sa zvieratá (s výnimkou myší) noc pred odobratím vzoriek krvi nekŕmili. Je potrebné vyšetriť tieto parametre (30): glukóza, močovina (močovinový dusík), kreatinín, celkový obsah bielkovín, albumín, vápnik, sodík, draslík, celkový cholesterol, najmenej dva vhodné testy na hepatocelulárne hodnotenie (alanín-aminotransferáza, aspartát-aminotransferáza, glutamát-dehydrogenáza, celkový obsah žlčových kyselín) (31) a najmenej dva vhodné testy na hepatobiliárne hodnotenie (alkalín-fosfatáza, gama-glutamyl-transferáza, 5-nukleotidáza, celkový bilirubín, celkový obsah žlčových kyselín) (31). Podľa potreby sa v závislosti od toxicity testovanej chemikálie môžu merať ďalšie parametre klinickej chémie, ako je hladina triglyceridov nalačno, špecifické hormóny a cholínsteráza. Vo všeobecnosti treba zaujať flexibilný postoj v závislosti od pozorovaného a/alebo očakávaného účinku danej testovanej chemikálie.

▼M4

43. Rozbor moču sa vykonáva najmenej pri desiatich samcoch a desiatich samiciach v každej skupine zo vzoriek odobratých v rovnakých intervaloch ako v prípade hematológie a klinickej chémie. Nie je nutné vykonať merania po troch mesiacoch, ak v predchádzajúcej 90-dňovej štúdii vykonanej pri porovnateľných úrovniach dávok nebol v rozbore moču pozorovaný žiadny účinok. Do odborného odporúčania pre štúdie klinickej patológie bol zahrnutý tento zoznam parametrov (30): vzhľad, objem, osmolalita alebo špecifická váha, pH, celkový obsah bielkovín a glukóza. Medzi ostatné parametre patria ketón, urobilinogén, bilirubín a okultné krvácanie. Ďalšie parametre sa môžu použiť, ak je potrebné rozšíriť vyšetrovanie pozorovaných účinkov.

44. Vo všeobecnosti je potrebné určiť základné hematologické ukazovatele a ukazovatele klinickej biochémie pred začatím testovania v štúdiách psov, ale nemusia sa určiť v štúdiách hlodavcov (30). Ak však historické základné údaje (pozri odsek 50) nie sú vhodné, treba uvažovať o získaní týchto údajov.

Patológia

Makroskopická pitva

45. Všetky zvieratá v štúdii sa zvyčajne podrobujú kompletnej podrobnej makroskopickej pitve, ktorá zahŕňa dôkladné skúmanie vonkajšieho povrchu tela, všetkých telesných otvorov a lebečnej, hrudnej a brušnej dutiny a ich obsahu. Môžu sa však takisto zabezpečiť (v prípade priebežného utrácania alebo satelitných skupín), aby sa merania obmedzovali na špecifické kľúčové ukazovatele, ako je neurotoxicita alebo imunotoxicita (pozri odsek 19). Tieto zvieratá sa nemusia podrobiť pitve ani ďalším postupom opísaným v nasledujúcich odsekoch. Pri sentinelových zvieratách môže byť v závislosti od konkrétneho prípadu potrebná pitva, o ktorej rozhodne vedúci štúdie.

46. Orgánové hmotnosti by sa mali zistiť pri všetkých zvieratách, s výnimkou tých, ktoré sú vylúčené podľa ďalšej časti odseku 45. Nadobličky, mozog, nadsemenníky, srdce, obličky, pečeň, vaječníky, slezina, semenníky, štítna žľaza (vážená po fixácii, s prištítnymi telieskami) a maternica zo všetkých zvierat (okrem tých, pri ktorých sa zistilo chradnutie alebo ktoré sa priebežne utratili) by sa mali upraviť na priľnavej tkanine a je potrebné čo najrýchlejšie po disekcii zistiť ich mokrú hmotnosť, aby sa zabránilo vyschnutiu. V štúdii myší nie je povinné vážiť nadobličky.

47. Tieto tkanivá by sa mali uchovávať v čo najvhodnejšom fixačnom médiu na obidva typy tkanív a na neskoršie histopatologické vyšetrenie (32) (vyšetrenia tkanív v hranatých zátvorkách sú nepovinné):

Všetky makroskopické poškodenia	srdce	pankreas	žalúdok (predný žalúdok, žľaznatý žalúdok)
nadoblička	ileum	prištítne teliesko	[zuby]
aorta	lačník	periférny nerv	semenníky
mozog (vrátane častí predného mozgu, mozočka a predĺženej miechy/mosta)	oblička	hypofýza	týmus
slepé črevo	slzná žľaza (extraorbitálna)	prostata	štítna žľaza
krčok maternice	pečeň	rektum	[jazyk]

▼M4

koagulačná žľaza	pľúca	slinná žľaza	priedušnica
hrubé črevo	lymfatické uzliny (povrchové aj hlboké)	semenný mechúrik	močový mechúr
dvanástnik	prsná žľaza (povinné pri samiciach, a ak je zrejmé, že možno urobiť disekciu, aj pri samcoch)	kostrové svaly	maternica (vrátane krčka maternice)
nadsemenníky	[horný dýchací trakt vrátane nosa, nosových mušlí a prínosových dutín]	koža	[močovod]
oko (vrátane sietnice)	pažerák	miecha (na troch úrovniach: krčnej, hrudnej a lumbálnej)	[močová rúra]
[stehnová kosť s kĺbom]	[čuchový bulbus]	slezina	vagína
žlčník (v prípade iných druhov zvierat ako potkany)	vaječníky	[hrudná kosť]	prierez kostnej drene a/alebo čerstvý aspirát kostnej drene
Harderova žľaza			

V prípade párových orgánov, ako sú napríklad obličky a nadobličky, sa zachovajú obidva orgány. Z klinických a iných nálezov môže vyplynúť potreba vyšetrenia ďalších tkanív. Takisto by sa mali zachovať všetky orgány, ktoré vzhľadom na známe vlastnosti testovanej chemikálie možno považovať za cieľové orgány. V štúdiách, v ktorých sa chemikália podáva dermálne, je zoznam orgánov rovnaký ako v prípade orálneho podávania, pričom je nevyhnutný špecifický odber vzorky a zachovanie kože z miesta aplikácie chemikálie. V inhalačných štúdiách sa zoznam zachovaných a skúmaných tkanív dýchacieho traktu zostaví na základe odporúčaní kapitoly B.8 tejto prílohy (8) a kapitoly B.29 tejto prílohy (9). Pokiaľ ide o orgány/tkanivá (a popri špecificky uchovávaných tkanivách dýchacieho traktu), je potrebné vyšetriť tie isté orgány ako v prípade orálnej expozície.

Histopatológia

48. K dispozícii sú usmernenia o najlepších postupoch na vykonávanie štúdií toxikologickej patológie (32). Histopatologickým vyšetreniam sa podrobia minimálne:

— všetky tkanivá zo skupín s vysokou dávkou a kontrolných skupín,

— všetky tkanivá zo zvierat, ktoré uhynuli alebo boli utratené v priebehu štúdie,

— všetky tkanivá vykazujúce makroskopické abnormality,

— cieľové tkanivá alebo tkanivá, ktoré v skupinách s vysokou dávkou vykazujú zmeny spôsobené aplikáciou chemikálie, zo všetkých zvierat zo všetkých skupín s odlišným dávkovaním,

— v prípade párových orgánov, ako sú napríklad obličky alebo nadobličky, sa vyšetria obidva orgány.

▼M4

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

49. Pri všetkých hodnotených parametroch sa uvedú údaje o jednotlivých zvieratách. Navyše všetky údaje sa musia zhrnúť v tabuľkovej forme, pričom ukazujú pre každú testovanú skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat uhynutých počas testu alebo usmrtených z humánnych dôvodov, čas uhynutia alebo humánneho usmrtenia jednotlivých zvierat, počet zvierat, pri ktorých sa prejavili známky toxicity, opis pozorovaných známok toxicity vrátane nástupu, času a prudkosti toxických účinkov, počet zvierat vykazujúcich poškodenie, typy poškodení a percentuálne množstvo zvierat, pri ktorých sa prejavil daný typ poškodenia. Zhrnuté údaje v tabuľkách musia okrem stupňa poškodení udávať priemer a smerodajnú odchýlku (v prípade priebežných údajov o teste) pri zvieratách vykazujúcich toxické účinky alebo poškodenia.

50. Pri interpretácii výsledkov štúdie môžu byť užitočné historické kontrolné údaje, napr. v prípade, ak existujú indikácie, že údaje získané v rámci súbežných kontrol sa výrazne odlišujú v porovnaní s novými údajmi pri kontrolných zvieratách z rovnakého testovacieho zariadenia/kolónie. V prípade hodnotenia historických kontrolných údajov by ich malo predložiť to isté laboratórium a mali by sa vzťahovať na zvieratá rovnakého veku a z toho istého kmeňa vytvoreného v priebehu piatich rokov, ktoré danej štúdii predchádzali.

51. Ak je to možné, numerické výsledky budú spracované vhodnou a všeobecne uplatniteľnou štatistickou metódou. Štatistické metódy a údaje, ktoré budú analyzované, sa vyberú počas plánovania štúdie (odsek 8). Výber musí v prípade potreby počítať s úpravami vzhľadom na prežitie.

Správa o teste

52. Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— fyzikálny charakter, čistota a fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikačné údaje,

— zdroj chemikálie,

— číslo šarže,

— certifikát chemickej analýzy.

Nosič (v prípade potreby):

— odôvodnenie výberu nosiča (ak je iný ako voda).

Testovacie zvieratá:

— použitý druh/kmeň a odôvodnenie výberu,

— počet, vek a pohlavie zvierat na začiatku testu,

▼M4

— zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo atď.,

— hmotnosti jednotlivých zvierat na začiatku testu.

Podmienky testovania:

— odôvodnenie spôsobu podávania a výberu dávky,

— ak je to použiteľné, štatistické metódy použité na analýzu údajov,

— údaje o príprave testovanej chemikálie/krmiva,

— analytické údaje o dosiahnutej koncentrácii, stabilite a homogenite prípravku,

— spôsob podávania a údaje o podávaní testovanej chemikálie,

— v prípade inhalačných štúdií, či ide o expozíciu oblasti nosa alebo expozíciu celého tela,

— skutočné dávky (mg/kg telesnej hmotnosti/deň), faktor konverzie z potravy/pitnej vody, koncentrácia testovanej chemikálie (mg/kg alebo ppm), ak je to použiteľné,

— podrobné informácie o kvalite potravy a vody.

Výsledky (predloží sa tabuľkové zhrnutie údajov a údaje o jednotlivých zvieratách):

— údaje o prežití,

— telesná hmotnosť a zmeny telesnej hmotnosti,

— spotreba potravy, výpočty účinnosti krmiva, pokiaľ sa vykonali, a spotreba vody, ak je to použiteľné,

— údaje o toxikologickej reakcii podľa pohlavia a úrovne dávky vrátane príznakov toxicity,

— povaha, rozsah (a ak sa hodnotí, závažnosť) a trvanie klinických pozorovaní (či už prechodných alebo stálych),

— oftalmologické vyšetrenia,

— hematologické testy,

— testy klinickej biochémie,

— testy rozboru moču,

— výsledky všetkých vyšetrení neurotoxicity alebo imunotoxicity,

— konečná telesná hmotnosť,

— orgánové hmotnosti (a ich pomery, ak je to použiteľné),

— pitevné nálezy,

— podrobný opis všetkých histopatologických nálezov súvisiacich s aplikáciou chemikálie,

— absorpčné údaje, ak sú dostupné.

▼M4

Štatistické spracovanie výsledkov v prípade potreby

Rozbor výsledkov zahŕňajúci:

— vzťah medzi dávkou a reakciou,

— zváženie všetkých informácií o druhu pôsobenia,

— rozbor všetkých prístupov modelovania,

— stanovenie BMD, NOAEL alebo LOAEL,

— historické kontrolné údaje,

— význam pre človeka.

Závery

LITERATÚRA

1. OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rím, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paríž.

2. Combes, R. D., Gaunt, I., Balls, M. (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163 – 208.

3. Barlow, S. M., Greig, J. B., Bridges, J. W. a kol. (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40, 145 – 191.

4. Chhabra, R. S., Bucher, J. R., Wolfe, M., Portier, C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437 – 445.

5. Kapitola B.27 tejto prílohy, Test subchronickej orálnej toxicity: opakovaná 90-dňová štúdia orálnej toxicity u nehlodavcov.

6. OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – druhé vydanie. Series on Testing and Assessment No. 116, dostupné na verejnej webovej stránke OECD s usmerneniami na vykonávanie testov na adrese www.oecd.org/env/testguidelines.

7. OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paríž.

8. Kapitola B.8 tejto prílohy, Subakútna inhalačná toxicita: 28-dňová štúdia.

9. Kapitola B.29 tejto prílohy, Subchronická inhalačná toxicita: 90-dňová štúdia

10. Kapitola B.9 tejto prílohy, Toxicita po 28–dňovej opakovanej dávke (dermálna).

11. Carmichael, N. G., Barton, H. A., Boobis, A. R. a kol. (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1 – 7.

12. Barton, H. A., Pastoor, T. P., Baetcke, T. a kol. (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9 – 35.

13. Doe, J. E., Boobis, A. R., Blacker, A. a kol. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37 – 68.

▼M4

14. Cooper, R. L., Lamb, J. S., Barlow, S. M. a kol. (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69 – 98.

15. OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paríž.

16. OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paríž.

17. Rhomberg, L. R., Baetcke, K., Blancato, J., Bus, J., Cohen, S., Conolly, R., Dixit, R., Doe, J., Ekelman, K., Fenner-Crisp, P., Harvey, P., Hattis, D., Jacobs, A., Jacobson-Kram, D., Lewandowski, T., Liteplo, R., Pelkonen, O., Rice, J., Somers, D., Turturro, A., West, W., Olin, S. (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 – 837.

18. ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran, J. A. (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

19. Smernica Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ z 22. septembra 2012 o ochrane zvierat používaných na vedecké účely (Ú. v. EÚ L 276, 20.10.2010, s. 33).

20. National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

21. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

22. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

23. Diehl, K.-H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J.-M., van de Vorstenbosch, C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21: 15 – 23.

24. IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

25. Tupper, D. E., Wallace, R. B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999 – 1003.

26. Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol.Environ. Health 9: 691 – 704.

27. Moser, V. C., McDaniel, K. M., Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267 – 283.

28. Meyer, O. A., Tilson, H. A., Byrd, W. C., Riley, M. T. (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233 – 236.

29. Crofton, K. M., Howard, J. L., Moser, V. C., Gill, M. W., Reiter, L. W., Tilson, H. A., MacPhail, R. C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599 – 609.

▼**M4**

30. Weingand, K., Brown, G., Hall R. a kol. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198 – 201.

31. EMEA (draft) document „Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity“ (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

32. Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK et al. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126 – 131.

▼**M4**

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMU

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

▼B

B.31. ŠTÚDIA PRENATÁLNEJ VÝVOJOVEJ TOXICITY

1. METÓDA

Táto metóda zodpovedá OECD TG 414 (2001).

1.1. ÚVOD

Táto metóda na testovanie vývojovej toxicity je určená na poskytnutie všeobecnej informácie týkajúcej sa účinkov prenatálnej expozície na gravidné pokusné zviera a na vývoj organizmu v utere; sem môže patriť hodnotenie účinkov na matku, ako aj uhynutie, štrukturálne abnormality alebo poruchy rastu plodu. Funkčné poruchy, aj keď sú dôležitou časťou vývoja, nie sú integrálnou časťou tejto testovacej metódy. Môžu byť testované na tieto účinky v oddelenej štúdii alebo ako doplnok k tejto štúdii, s použitím testovacej metódy pre vývojovú neurotoxicitu. Informácie o testovaní funkčných porúch a iných postnatálnych účinkov sa dajú v prípade potreby získať z testovacej metódy pre dvojgeneračnú štúdiu reprodukčnej toxicity a štúdiu vývojovej neurotoxicity.

Táto testovacia metóda môže vyžadovať, aby sa jednotlivé testy osobitne upravili na základe konkrétnych poznatkov napr. o fyzikálno-chemických alebo toxikologických vlastnostiach testovanej látky. Takáto úprava je prípustná, ak na základe presvedčivého vedeckého dôkazu vyplýva, že úprava vedie k spoľahlivejšiemu testu. V takomto prípade sa tento vedecký dôkaz starostlivo zdokumentuje v správe zo štúdie.

1.2. DEFINÍCIE

Vývojová toxikológia: štúdia nepriaznivých účinkov na vyvíjajúci sa organizmus, ktoré môže zapríčiniť expozícia pred počatím, počas prenatálneho vývoja alebo postnatálne do obdobia sexuálnej zrelosti. K hlavným prejavom vývojovej toxicity patrí 1. smrť organizmu, 2. štrukturálna abnormalita, 3. poruchy rastu a 4. funkčné poruchy. Vývojová toxikológia sa predtým označovala ako teratológia.

Nepriaznivý účinok: každá zmena voči normálnemu stavu v súvislosti s ošetrením, ktorá znižuje schopnosť organizmu prežiť, reprodukovať sa alebo prispôsobovať sa prostrediu. V širšom zmysle vývojová toxikológia zahrnuje každý účinok, ktorý vplýva na normálny vývoj zárodku ako pred narodením, tak aj a po narodení.

Porucha rastu: zmena hmotnosti alebo veľkosti orgánov, alebo tela potomstva.

Zmeny (anomálie): štrukturálne zmeny vo vývoji, ktoré zahrnujú malformácie a aj odchýlky (28).

Malformácia/veľká abnormalita: Štrukturálna zmena, ktorá sa pokladá za škodlivú pre zviera (môže byť tiež smrteľná) a je zvyčajne zriedkavá.

▼B

Odchýlka/malá abnormalita: štrukturálna zmena, o ktorej sa usudzuje, že má malý alebo žiadny škodlivý účinok na zviera; môže byť prechodná a môže sa vyskytovať pomerne často v kontrolnej populácii.

Zárodok: suma derivátov oplodneného vajíčka v každom štádiu vývoja od oplodnenia do narodenia vrátane extraembryonálnych membrán, ako aj embrya alebo plodu.

Implantácia (nidácia): uchytenie blastocysty v epitelovej výstelke uteru, vrátane jej penetrácie cez epitel utera a jej zahniezdenie do endometria.

Embryo: skoré štádium alebo vývojové štádium každého organizmu, najmä vyvíjajúceho sa produktu oplodnenia vajíčka po vzniku pozdĺžnej osi a pokiaľ nie sú prítomné všetky hlavné štruktúry.

Embryotoxicita: škodlivé pre normálnu štruktúru, vývoj, rast a/alebo životaschopnosť embrya.

Plod: nenarodené potomstvo v postembryonálnom období.

Fetotoxicita: škodlivé pre normálnu štruktúru, vývoj, rast a/alebo životaschopnosť plodu.

Potrat: predčasné vypudenie produktov oplodnenia z uteru: embrya alebo neživotaschopného plodu.

Resorpcia: zárodok, ktorý po implantovaní do uteru uhynul a vstrebáva sa alebo sa vstrebal.

Skorá resorpcia: dôkaz implantácie bez toho, aby sa dalo embryo/plod rozoznať.

Neskorá resorpcia: mŕtve embryo alebo plod s vonkajšími degeneratívnymi zmenami.

NOAEL: skratka pre hladinu bez pozorovaného nepriaznivého účinku, je to najvyššia dávka alebo úroveň expozície, pri ktorej sa nepozorujú žiadne nepriaznivé zistenia v súvislosti s ošetrením.

1.3. REFERENČNÁ LÁTKA

Žiadna.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Testovaná látka sa zvyčajne podáva gravidným zvieratám v dobe aspoň od implantácie do jedného dňa pred naplánovaným dňom usmrtenia, ktorý má byť čo možno najbližšie k zvyčajnému dňu pôrodu bez ohrozenia straty údajov následkom predčasnému pôrodu. Testovacia metóda nie je určená iba na skúmanie obdobia organogenézy (t. j. 5 – 15 dní u hlodavcov (myši, potkany, škrečky) a 6 – 18 dní u králikov), ale aj účinkov od obdobia preimplantácie, v prípade potreby, počas celého obdobia gravidity do dňa, keď sa uskutoční cisársky rez. Tesne pred uskutočnením cisárskeho rezu sa samice usmrtia, obsah uteru sa vyšetrí a posúdia sa vonkajšie viditeľné anomálie na plodoch a zmeny na mäkkých tkanivách a kostre.

▼B

1.5. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.5.1. **Výber druhu zvierat**

Odporúča sa, aby sa testovanie uskutočnilo na najvhodnejších druhoch a aby sa použili laboratórne druhy a kmene, ktoré sa zvyčajne používajú pri testovaní prenatálnej vývojovej toxicity. Z hlodavcov sa uprednostňuje potkan a z nehlodavcov králik. Použitie iných druhov je potrebné zdôvodniť.

1.5.2. **Podmienky pre umiestnenie a kŕmenie**

Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 °C (± 3 °C) pre hlodavce a 18 °C (± 3 °C) pre králiky. Aj keď relatívna vlhkosť by mala byť aspoň 30 % a pokiaľ možno nemala by prevyšovať 70 %, okrem obdobia počas čistenia miestnosti by mala dosahovať 50 – 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé, v rytme 12 hodín svetlo, 12 hodín tma. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody.

Párenie sa uskutoční v klietkach vhodných na tento účel. Aj keď sa uprednostňuje jednotlivé umiestnenie spárených zvierat, spoločné umiestnenie v malých počtoch je tiež prípustné.

1.5.3. **Príprava zvierat**

Použijú sa zdravé zvieratá, ktoré sa aklimatizovali na laboratórne podmienky aspoň 5 dní a ktoré sa predtým nepodrobili iným experimentom. Pokusné zvieratá sa charakterizujú na základe druhu, kmeňa, zdroja, pohlavia, hmotnosti a/alebo veku. Zvieratá vo všetkých pokusných skupinách majú mať, pokiaľ je to možné, rovnakú hmotnosť a vek. Na každú veľkosť dávky sa použijú mladé dospelé, panenské samice. Samice sa spária so samcami rovnakého druhu a kmeňa a je potrebné zabrániť páreniu medzi súrodencami. Pre hlodavce je deň 0 gravidity dňom, keď sa zistila vaginálna zátka a/alebo sperma; pre králiky deň 0 je zvyčajne deň, keď sa uskutočnil koitus alebo umelé oplodnenie, ak sa použila táto technika. Spárené samice sa náhodne rozdelia do kontrolnej a pokusnej skupiny. Klietky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy kvôli umiestneniu klietok. Každému zvieraťu sa priradí vlastné identifikačné číslo. Spárené samice sa náhodne rozdelia do kontrolnej a ošetrenej skupiny a ak sa samice párili v skupinách, zvieratá v každej skupine sa rovnomerne rozdelia do uvedených skupín. Podobne sa rovnomerne rozdelia do skupín samice oplodnené rovnakým samcom.

1.6. POSTUP

1.6.1. **Počet a pohlavie zvierat**

Každá pokusná a kontrolná skupina by mala obsahovať dostatočný počet samíc tak, aby bolo k dispozícii približne 20 samíc s implantačnými miestami na autopsiu. Skupiny, ktoré majú menej ako 16 zvierat s implantačnými miestami, sú nevhodné. Úmrtnosť materských zvierat nevedie nevyhnutne k tomu, že štúdia je neplatná, ak nedosahuje viac ako 10 %.

▼B

1.6.2. **Príprava dávok**

Ak sa na uľahčenie dávkovania používa nosič alebo iná prídavná látka, je potrebné venovať pozornosť týmto charakteristikám: účinky na absorpciu, distribúciu, metabolizmus a retenciu alebo vylúčenie testovanej látky; metódy na chemické vlastnosti testovanej látky, ktorý môže zmeniť jej toxické vlastnosti; a vplyv najvhodnejších spotrebu potravy a vody alebo nutričný stav zvierat. Nosič by nemal spôsobovať vývojovú toxicitu, ani by nemal mať vplyv na reprodukciu.

1.6.3. **Dávkovanie**

Testovaná dávka sa zvyčajne podáva každý deň od implantácie (napr. 5 dní po párení) do dňa naplánovaného uskutočnenia cisárskeho rezu. Ak predbežné štúdie, ktoré sú prípadne dispozícii, neuvádzajú veľkú pravdepodobnosť preimplantačných strát, ošetrenie sa môže predĺžiť na celé obdobie gravidity, od párenia do dňa naplánovaného usmrtenia. Je dobre známe, že nevhodné zaobchádzanie alebo stres počas gravidity môžu mať za následok prenatálne straty. Na ochranu proti prenatálnym stratám zapríčineným faktormi, ktoré nesúvisia s ošetrením, je potrebné zabrániť zbytočnej manipulácii s gravidnými zvieratami, ako aj stresu spôsobenému vonkajšími faktormi, ako napríklad hluk.

Použijú sa aspoň tri veľkosti dávok a uskutoční sa paralelná kontrola. Zdravé zvieratá sa náhodne rozdelia do kontrolnej a pokusnej skupiny. Dávky sa rozložia tak, aby sa toxické účinky zvyšovali. Pokiaľ neexistujú žiadne obmedzenia na základe fyzikálneho/chemického charakteru a biologických vlastností testovanej látky, zvolí sa najvyššia dávka s cieľom vyvolať nejakú vývojovú toxicitu a/alebo toxicitu u matiek (klinické príznaky alebo úbytok telesnej hmotnosti), ale nie uhynutie alebo silné utrpenie. Aspoň jedna zo prechodných dávok má viesť k minimálnym viditeľným toxickým účinkom. Najnižšia dávka by nemala spôsobiť žiadny prejav toxicity u materských zvierat, ani vývojovej toxicity. Klesajúca postupnosť dávok sa zvolí tak, aby sa preukázala každá reakcia v závislosti od dávkovania a hladina bez pozorovaného nepriaznivého účinku (NOAEL). Intervaly dávkovania s faktorom sperma; až štyri sú často optimálne na stanovenie klesajúceho dávkovania a pridanie štvrtej pokusnej skupiny je často vhodnejšie ako používanie veľmi veľkých intervalov (napr. viac ako faktor 10) medzi dávkami. Aj keď stanovenie NOAEL u matiek je cieľom, štúdie, pri ktorých sa nestanovuje táto hladina, môžu byť tiež prípustné (1).

Veľkosti dávok sa zvolia tak, aby zohľadnili všetky existujúce údaje o toxicite, párili aj ďalšie informácie o metabolizme a toxikokinetike testovanej látky alebo príbuzných materiálov. Tieto informácie napomôžu aj pri preukazovaní vhodnosti režimu dávkovania.

Použije sa paralelná kontrolná skupina. Touto skupinou bude zdanlivo ošetrovaná kontrolná skupina alebo kontrolná skupina ošetrovaná nosičom, ak sa používa nosič na podávanie testovanej látky. Všetkým skupinám sa podáva rovnaký objem buď testovanej látky alebo nosiča. So zvieratami v kontrolnej(-ých) skupine(-ách) sa zaobchádza rovnakým spôsobom ako so zvieratami v pokusných skupinách. Kontrolné skupiny, ktorým sa podáva nosič, viac nosič v najvyššej používanej dávke (ako v skupine s najnižším dávkovaním).

▼B

1.6.4 **Limitný test**

Ak sa na základe testu s orálne podanou jednou dávkou minimálne 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň s použitím postupov uvedených pre túto štúdiu nezistí žiadna pozorovateľná toxicita buď u gravidných zvierat, alebo ich potomkoch a ak sa účinok neočakáva na základe existujúcich údajov (napr. zo štrukturálne a/alebo metabolický príbuzných látok), potom sa môže upustiť od úplnej štúdie s použitím troch dávok. Z predpokladanej expozície ľudí môže vyplývať potreba, aby sa v limitnom teste použili vyššie orálne dávky. Pri iných typoch podávania, ako napr. vdychovaním alebo aplikáciou cez kožu, fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej látky často môžu poukázať a limitovať maximálnu prípustnú úroveň expozície (napríklad aplikácia cez kožu by nemala spôsobiť silnú lokálnu toxicitu).

1.6.5. **Podávanie dávok**

Testovaná látka alebo nosič sa zvyčajne podáva orálne pomocou intubácie. Ak sa použije iná cesta podávania, je potrebné, aby experimentátor uviedol zdôvodnenie a argumenty pre túto voľbu a môžu byť potrebné príslušné úpravy (2) (3) (4). Testovaná látka sa podáva každý deň približne v rovnakom čase.

Dávka pre jednotlivé zvieratá sa zvyčajne zakladá na naposledy zistenej telesnej hmotnosti. Je však potrebné venovať pozornosť pri nastavovaní dávky počas posledného trimestra gravidity. Je potrebné použiť existujúce údaje na výber dávky, aby sa zabránilo nadmernej toxicite matky. Ak sa však zaznamená nadmerná toxicita u ošetrených matiek, tieto zvieratá sa humánnym spôsobom usmrtia. Ak niektoré gravidné zvieratá vykazujú príznaky nadmernej toxicity, je potrebné zvážiť usmrtenie celej skupiny s touto dávkou. Ak sa látka podáva cez sondu, pokiaľ možno sa podá zvieratám ako jednorazová dávka s použitím žalúdkovej sondy alebo vhodnej intubačnej kanyly. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže jednorazovo podať, závisí od veľkosti pokusného zvieraťa. Objem nemá byť vyšší ako 1 ml/100 g telesnej hmotnosti, okrem vodných roztokov, keď sa môže použiť 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Ak sa použije ako nosič kukuričný olej, objem nemá byť vyšší ako 0,4 ml/100 g telesnej hmotnosti. Zmeny v aplikovanom objeme sa minimalizujú tým, že sa koncentrácie upravia tak, aby sa zabezpečil stály objem vo všetkých dávkach.

1.6.6. **Pozorovanie matiek**

Klinické vyšetrenie sa uskutoční a zaznamená aspoň raz za deň, pokiaľ možno v rovnakom(-ých) čase(-och) každý deň pri zohľadnení obdobia, keď sa predpokladajú maximálne účinky po podaní dávky. Stav zvierat sa zaznamená, vrátane mortality, moribundného stavu, trvalých zmien v správaní a všetkých príznakov zjavnej toxicity.

1.6.7. **Telesná hmotnosť a spotreba potravy**

Zvieratá sa odvážia v 0. deň gravidity alebo najneskôr na 3. deň gravidity, ak sú dodané zvieratá od externého chovateľa spárené na základe časových údajov, v prvý deň dávkovania, aspoň každé 3 dni počas obdobia dávkovania a v deň naplánovaného usmrtenia.

▼B

Spotreba potravy sa zaznamená v trojdňových intervaloch a má sa zhodovať s dňami, keď sa zisťuje telesná hmotnosť.

1.6.8. **Vyšetrenie post mortem**

Samice sa usmrtia jeden deň pred očakávaným dňom vrhu. Samice, ktoré vykazujú príznaky potratu alebo predčasného pôrodu pred naplánovaným usmrtením, sa usmrtia a podrobia dôkladnému makroskopickému vyšetreniu.

V čase usmrtenia alebo uhynutia počas štúdie sa matka vyšetrí makroskopicky na všetky štrukturálne abnormality alebo patologické zmeny. Posúdenie matiek počas cisárskeho rezu a následná analýza plodov sa uskutoční podľa možnosti bez vedomosti o tom, či ide o ošetrovanú skupina, aby sa minimalizovalo ovplyvnenie.

1.6.9. **Vyšetrenie obsahu uteru**

Bezprostredne po usmrtení alebo čo najskôr po uhynutí sa odoberie uterus a zistí sa stav gravidity u zvierat. Ak uterus nevykazuje graviditu, je potrebné ho ďalej vyšetriť (napr. farbením sírnikom amónnym pre hlodavce a Salewského farbením alebo vhodnou alternatívnou metódou pre králiky) na potvrdenie negravidného stavu (5).

Gravidný uterus, vrátane cervixu, sa odváži. Nie je potrebné zisťovať hmotnosť gravidného uteru u zvierat, ktoré uhynuli počas štúdie.

Pri gravidných zvieratách sa určí počet žltých teliesok (corpora lutea).

Obsah uteru sa vyšetrí na počet mŕtvych embryí alebo plodov alebo počet životaschopných plodov. Stupeň resorpcie sa opíše, aby sa mohol odhadnúť relatívny čas uhynutia zárodku (pozri oddiel 1.2).

1.6.10. **Vyšetrenie plodov**

Určí sa pohlavie a telesná hmotnosť každého plodu.

Každý plod sa vyšetrí na vonkajšie zmeny (6).

Plody sa vyšetria na zmeny na skelete a mäkkých tkanivách (napr. odchýlky a malformácie alebo anomálie) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24). Kategorizácia fetálnych zmien sa odporúča, ale nevyžaduje. Keď sa uskutoční kategorizácia, jasne sa stanovia kritériá definujúce každú kategóriu. Je potrebné venovať osobitnú pozornosť reprodukčnému traktu, ktorý by sa mal vyšetriť na príznaky zmien vo vývoji.

V prípade hlodavcov sa pripraví približne polovica vrhu a vyšetrí na zmeny na skelete. Zvyšok sa pripraví a vyšetrí na zmeny mäkkých tkanív s použitím uznaných alebo vhodných metód sériových rezov alebo dôkladných pitevných techník.

▼B

V prípade nehlodavcov, napr. králiky, sa všetky plody vyšetria na zmeny mäkkých tkanív a aj na zmeny na skelete. Telá týchto plodov sa podrobia dôkladnej autopsii na vyšetrenie zmien mäkkých tkanív, ktoré môžu zahrnovať postupy pre ďalšie posúdenie internej štruktúry srdca (25). Hlavy jednej polovice plodov vyšetrených týmto spôsobom sa odstránia a spracujú, aby sa posúdili zmeny mäkkých tkanív (vrátane očí, mozgu, nosového priechodu a jazyka) s použitím štandardných metód sériových rezov (26) alebo rovnako citlivou metódou. Telá týchto plodov a zvyšné neporušené plody sa spracujú a vyšetria na zmeny na skelete s použitím rovnakých metód, ako boli opísané pre hlodavce.

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje sa zaprotokolujú jednotlivo pre matky, ako aj pre ich potomstvo a zosumarizujú vo forme tabuliek a uvedie sa pre každú pokusnú skupinu a každú generáciu počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat, ktoré uhynuli počas testu, alebo sa usmrtili z humánnych dôvodov, čas každého úmrtia alebo humánneho usmrtenia, počet gravidných samíc, počet zvierat vykazujúcich príznaky toxicity, opis zistených príznakov toxicity, vrátane času nástupu, trvania a závažnosti všetkých toxických účinkov, typy vyšetrení embrya/plodu a všetky údaje týkajúce sa vrhu.

Číselné výsledky sa vyhodnotia vhodnou štatistickou metódou, pričom sa na analýzu údajov ako jednotka použije vrh. Použije sa všeobecne uznávaná štatistická metóda; štatistické metódy sa zvolia ako súčasť plánu štúdie a zdôvodnia sa. Údaje týkajúce sa zvierat, ktoré neprežili do naplánovaného usmrtenia, sa tiež zaznamenajú. Tieto údaje sa môžu zahrnúť do tej skupiny priemerov zvierat, ktorej sa týkajú. Závažnosť údajov, získaných od takýchto zvierat, a teda zahrnutie alebo vylúčenie z priemeru(-ov) ktorejkoľvek skupiny sa zdôvodní a individuálne posúdi.

2.2. VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV

Zistenia štúdie prenatálnej vývojovej toxicity sa vyhodnotia na základe zistených účinkov. Hodnotenie bude obsahovať tieto informácie:

— výsledky testu na matkách a embryách/plodoch, vrátane posúdenia vzťahu alebo neprítomnosti vzťahu medzi expozíciou zvierat testovanou látkou a výskytom a závažnosťou všetkých zistení,

— kritériá použité na kategorizáciu vonkajších zmien na plode, mäkkých tkanivách a skelete, ak sa uskutočnila kategorizácia,

▼B

— v prípade potreby historické kontrolné údaje na podporu interpretácie výsledkov štúdie,

— počty použité pri výpočte všetkých percent alebo indexov,

— vhodnú štatistickú analýzu zistení zo štúdie, ktoré by v prípade potreby mohli zahrnovať dostatočné informácie o analytickej metóde tak, aby nezávislý kontrolór/štatistik mohol prehodnotiť a zrekonštruovať analýzu.

V každej štúdii, pri ktorej sa nepreukázali žiadne toxické účinky, je potrebné zvážiť ďalšie vyšetrenia na stanovenie absorpcie a biologickej dostupnosti testovanej látky.

2.3. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Štúdia prenatálnej vývojovej toxicity poskytne informácie o účinkoch opakovanej expozície látkou počas gravidity na matkách a na vnútromaternicový vývoj ich potomstva. Výsledky štúdie sa interpretujú v spojitosti so zisteniami zo subchronických, reprodukčných, toxikokinetických a iných štúdií. Aj keď sa dôraz kladie na všeobecnú toxicitu, pokiaľ ide o toxicitu u matky a aj vývojovú toxicitu, výsledky štúdie umožnia do určitej miery rozlíšenie medzi účinkami na vývoj, ktoré sa vyskytnú pri neprítomnosti všeobecnej toxicity, a tých účinkov, ktoré sú vyvolané dávkami, ktoré sú toxické aj pre materské zviera (27).

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí obsahovať tieto konkrétne informácie:

Testovaná látka:

— fyzikálny charakter a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikácia vrátane čísla CAS, ak je známe/stanovené,

— čistota.

Nosič (v prípade potreby):

— zdôvodnenie výberu nosiča, ak je iný ako voda.

Pokusné zvieratá:

— použitý druh a kmeň,

— počet a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo atď.,

— hmotnosti jednotlivých zvierat na začiatku testu.

Podmienky testu:

— zdôvodnenie výberu veľkosti dávok,

— údaje o zložení testovanej látky/príprave krmiva, dosiahnutej koncentrácii, stabilite a homogenite prípravku,

▼B

— údaje o podávaní testovanej látky,

— prepočet koncentrácie testovanej látky v krmive/pitnej vode (ppm) na skutočnú dávku (mg/kg telesnej hmotnosti/deň), ak je potrebné,

— podmienky prostredia,

— údaje o kvalite krmiva a vody.

Výsledky:

Údaje toxickej reakcie matky podľa dávky okrem iného:

— počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat, ktoré prežili, počet gravidných zvierat a počet zvierat, ktoré potratili, počet zvierat, ktoré predčasne porodili,

— deň uhynutia počas štúdie, alebo či zvieratá prežili do usmrtenia,

— údaje o zvieratách, ktoré neprežili do naplánovaného usmrtenia, sa zaprotokolujú, ale sa nezahrnú do štatistických porovnaní medzi skupinami,

— deň zistenia každého nezvyčajného klinického príznaku a jeho ďalší priebeh,

— telesná hmotnosť, zmena telesnej hmotnosti a hmotnosť gravidného uteru, nepovinne vrátane zmeny telesnej hmotnosti upravenej o hmotnosť gravidného uteru,

— spotreba potravy, a ak sa meria, spotreba vody,

— pitevné nálezy, vrátane hmotnosti uteru,

— zaznamenajú sa hodnoty NOAEL pre účinky na matku a vývoj.

Vývojové údaje o vrhu s implantátmi, vrátane:

— počtu žltých teliesok (corpora lutea),

— počtu implantácií, počtu a percenta živých a mŕtvych plodov a resorpcií,

— počtu a percenta predimplatačných a poimplantačných strát.

Vývojové údaje o vrhu so živými plodmi, vrátane:

— počtu a percenta živého potomstva,

— pomeru pohlaví,

— telesnej hmotnosti plodu, pokiaľ možno podľa pohlavia a pre obe pohlavia spolu,

— vonkajšie malformácie, malformácie mäkkých tkanív a skeletu a iné závažné zmeny,

— kritériá pre kategorizáciu v prípade potreby,

▼B

— celkový počet a percento plodov a vrhov s každou vonkajšou zmenou, zmenou mäkkých tkanív alebo skeletu, ako aj typy výskytov jednotlivých anomálií a iných závažných zmien.

Diskusia k výsledkom

Závery

4. **ODKAZY**

(1) Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; 399 – 410.

(2) Kimmel, C.A. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14; 386 – 398.

(3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CIIT Activities* 17; 1 – 8.

(4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.

(5) Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterusder Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv fur Pharmakologie und Experimente lle Pathologie 247367.*

(6) Edwards, J.A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology.* D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.

(7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; 171 – 173.

(8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Techniquefor Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32; 381 – 391.

(9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47; 229 – 242.

(10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.

(11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127; 291 – 306.

(12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313 – 320.

(13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9; 398 – 408.

(14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology* 8; 309 – 316.

(15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46; 169 – 181.

▼B

(16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. *Supplement to Teratology Workshop Manual,* pp. 163 – 173.

(17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; 411 – 445.

(18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39; 61 – 63.

(19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (Mus Norvegicus Albinus) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36; 313 – 355.

(20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 4; 181 – 188.

(21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton.* Thomas, Springfield, IL.

(22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques,* Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp 251 – 277.

(23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology,* Vol. 4. Plenum, NY.

(24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 28; 233 – 239.

(25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 37 – 38.

(26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126 – 144.

(27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. *Federal Register* 56; 63798 – 63826.

(28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) Teratology 55; 249 – 292.

▼M4

B.32. ŠTÚDIE KARCINOGENITY

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s Usmerneniami OECD na vykonávanie testov (TG) 451 (2009). Pôvodné usmernenia TG 451 o štúdiách karcinogenity boli prijaté v roku 1981. Vypracovanie tejto revidovanej testovacej metódy B.32 sa považovalo za potrebné na zohľadnenie najnovšieho vývoja v oblasti starostlivosti o zvieratá a regulačných požiadaviek (2) (3) (4) (5) (6). Aktualizácia tejto testovacej metódy B.32 bola vykonaná súbežne s revíziou kapitoly B.30 tejto prílohy, Štúdie chronickej toxicity, a kapitoly B.33 tejto prílohy, Kombinované štúdie chronickej toxicity/karcinogenity, s cieľom získať ďalšie informácie pomocou zvierat použitých v štúdii a poskytnúť ďalšie podrobné údaje o výbere dávky. Táto testovacia metóda B.32 je vypracovaná na testovanie širokej škály chemikálií vrátane pesticídov a priemyselných chemikálií. Treba však poznamenať, že v prípade liekov sa niektoré podrobnosti a požiadavky môžu líšiť [pozri usmernenia S1B Medzinárodnej konferencie o zosúladení (ICH) o testovaní karcinogenity liekov].

2. Väčšina štúdií karcinogenity sa vykonáva na hlodavcoch a táto testovacia metóda sa preto primárne vzťahuje na štúdie vykonávané na týchto živočíšnych druhoch. Ak sa takéto štúdie budú vyžadovať v prípade nehlodavcov, takisto by sa s príslušnými úpravami mali uplatniť princípy a postupy uvedené v tejto testovacej metóde spolu s princípmi a postupmi uvedenými v kapitole B.27 tejto prílohy, 90-dňová štúdia orálnej toxicity pri nehlodavcoch v opakovaných dávkach (6). Ďalšie usmernenia sú k dispozícii v Usmerňovacom dokumente OECD č. 116 o príprave a vykonávaní štúdií chronickej toxicity a karcinogenity (7).

3. Tri hlavné spôsoby podávania používané v štúdiách karcinogenity sú orálne, dermálne a inhalačné podávanie. Výber spôsobu podávania závisí od fyzikálnych a chemických vlastností testovanej chemikálie a najčastejšieho spôsobu expozície u človeka. Ďalšie informácie o výbere spôsobu expozície sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7).

4. Táto testovacia metóda je zameraná na orálnu expozíciu, ktorá sa v štúdiách karcinogenity používa najčastejšie. Hoci štúdie karcinogenity využívajúce dermálnu alebo inhalačnú expozíciu môžu byť takisto potrebné na hodnotenie zdravotných rizík pre človeka a/alebo sa môžu vyžadovať v určitých regulačných režimoch, oba spôsoby expozície sú do značnej miery technicky zložité. Takéto štúdie budú musieť byť pripravené v závislosti od jednotlivých prípadov, hoci testovacia metóda, ktorá sa tu uvádza na posudzovanie a vyhodnocovanie karcinogenity pri orálnom podávaní, by mohla slúžiť ako základ protokolu pre inhalačné a/alebo dermálne štúdie vzhľadom na odporúčania týkajúce sa období testovania, klinických a patologických parametrov atď. K dispozícii sú usmernenia OECD o podávaní testovaných chemikálií dermálnym (7) a inhalačným spôsobom (7) (8). Pri príprave dlhodobejších štúdií zahŕňajúcich inhalačnú expozíciu je nutné si preštudovať najmä kapitolu B.8 tejto prílohy (9) a kapitolu B.29 tejto prílohy (10) spolu s Usmerňovacím dokumentom OECD o testovaní akútnej inhalačnej toxicity (8). Kapitolu B.9 tejto prílohy (11) je nutné konzultovať v prípade testovania dermálnej expozície.

▼M4

5. Štúdia karcinogenity poskytuje informácie o možnej nebezpečnosti pre zdravie, ktorá sa pravdepodobne vyskytne pri opakovanej expozícii v priebehu celej dĺžky života použitého živočíšneho druhu. Štúdia poskytne informácie o toxických účinkoch testovanej chemikálie vrátane potenciálnej karcinogenity a môže indikovať cieľové orgány a možnosť akumulácie. Môže zabezpečiť odhad hladiny bez pozorovaného nepriaznivého účinku pre toxické účinky a v prípade negenotoxických karcinogénov pre reakcie na nádory, ktorý možno použiť na stanovenie bezpečnostných kritérií týkajúcich sa expozície človeka. Takisto sa v nej zdôrazňuje nutnosť dôkladných klinických pozorovaní zvierat s cieľom získať čo najväčšie množstvo informácií.

6. Medzi ciele štúdie karcinogenity v rámci tejto testovacej metódy patrí:

— identifikácia karcinogénnych vlastností testovanej chemikálie, ktoré vedú k zvýšenému výskytu nádorov, zvýšenému podielu zhubných nádorov alebo k skráteniu času do výskytu nádorov v porovnaní so súbežnými kontrolnými skupinami,

— identifikácia cieľových orgánov karcinogenity,

— identifikácia času do výskytu nádorov,

— charakterizácia vzťahu medzi dávkou a reakciou v prípade nádorov,

— identifikácia hladiny bez pozorovaného nepriaznivého účinku (NOAEL) alebo východiska na stanovenie porovnávacej dávky (BMD),

— extrapolácia karcinogénnych účinkov na úrovne expozície človeka pri nízkych dávkach,

— poskytnutie údajov na testovanie hypotéz týkajúcich sa druhu pôsobenia (2) (7) (12) (13) (14) (15).

ÚVODNÉ ÚVAHY

7. Pri posudzovaní a vyhodnocovaní potenciálnej karcinogenity testovanej chemikálie testovacie laboratórium pred vykonaním štúdie zváži všetky dostupné informácie o testovanej chemikálii s cieľom zamerať prípravu štúdie na účinnejšie testovanie karcinogénneho potenciálu a minimalizovať využívanie zvierat. Informácie a úvahy o druhu pôsobenia podozrivého karcinogénu (2) (7) (12) (13) (14) (15) sú mimoriadne dôležité, lebo optimálne plánovanie sa môže líšiť v závislosti od toho, či je testovaná chemikália známym alebo podozrivým genotoxickým karcinogénom. Ďalšie usmernenia k úvahám o druhu pôsobenia sú uvedené v usmerňovacom dokumente č.116 (7).

8. Informácie, ktoré pomôžu pri príprave štúdie, zahŕňajú identitu, chemickú štruktúru a fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej chemikálie, výsledky všetkých testov toxicity *in vitro* alebo *in vivo* vrátane testov genotoxicity, predpokladané použitie (použitia) a potenciál pre expozíciu ľudí, dostupné údaje (Q)SAR, údaje o mutagenite/genotoxicite a iné toxikologické údaje o štrukturálne príbuzných chemikáliách, dostupné toxikokinetické údaje

▼M4

(kinetika pri jednej dávke a takisto pri opakovaných dávkach, ak je k dispozícii) a údaje získané z iných štúdií opakovanej expozície. Hodnotenie karcinogenity sa vykoná po získaní prvotných informácií o toxicite z 28-dňového a/alebo 90-dňového testu toxicity v opakovaných dávkach. Krátkodobé testy nástupu a šírenia rakoviny by takisto mohli priniesť užitočné informácie. Stratégiu fázového testovania pri testovaní karcinogenity treba zvážiť ako súčasť celkového hodnotenia potenciálnych nepriaznivých zdravotných účinkov danej testovanej chemikálie (16) (17) (18) (19).

9. Štatistické metódy, ktoré sú vzhľadom na prípravu pokusu a ciele na analýzu výsledkov najprimeranejšie, sa stanovia pred začatím štúdie. Je potrebné zvážiť, či by štatistiky nemali zahŕňať úpravu vzhľadom na prežitie zvierat, analýzu kumulatívnych nádorových rizík súvisiacich s dĺžkou prežitia, analýzu času do progresie nádoru a analýzu v prípade predčasného konca jednej alebo viacerých skupín. Usmernenia o vhodných štatistických analýzach a kľúčové odkazy na medzinárodne uznané štatistické metódy sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7), ako aj v Usmerňovacom dokumente č. 35 o analýze a hodnotení štúdií chronickej toxicity a karcinogenity (20).

10. Pri vykonávaní štúdie karcinogenity je vždy nutné sa riadiť hlavnými zásadami a úvahami uvedenými v Usmerňovacom dokumente OECD č. 19 o rozpoznaní, hodnotení a použití klinických príznakov ako humánnych parametrov pre pokusné zvieratá používané pri hodnotení bezpečnosti (21), najmä v odseku 62. V tomto odseku sa uvádza, že „ak v štúdiách s opakovanými dávkami zviera vykazuje klinické príznaky, ktoré sú progresívne a vedú k ďalšiemu zhoršeniu stavu, je potrebné na základe informácií rozhodnúť, či sa má zviera humánne usmrtiť alebo nie. Pri rozhodovaní treba zvážiť hodnotu informácií, ktoré by sa získali ďalším udržiavaním zvieraťa pri živote v rámci štúdie, v spojitosti s jeho celkovým stavom. Ak sa prijme rozhodnutie, že testovanie zvieraťa bude pokračovať, frekvencia pozorovaní by sa mala podľa potreby zvýšiť. Takisto je možné, bez toho, aby to malo negatívny vplyv na účel testu, dočasne pozastaviť podávanie dávok, ak sa tým zvieraťu uľaví od bolesti alebo utrpenia, alebo znížiť testovaciu dávku.“

11. Podrobné usmernenia a rozbor zásad výberu dávky v štúdiách chronickej toxicity a karcinogenity sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7), ako aj v dvoch publikáciách Medzinárodného inštitútu prírodných vied (International Life Sciences Institute) (22) (23). Základná stratégia výberu dávky závisí od primárneho cieľa alebo cieľov štúdie (odsek 6). Pri výbere vhodných úrovní dávky je potrebné dosiahnuť rovnováhu medzi skríningom nebezpečnosti na jednej strane a charakterizáciou reakcie na nízke dávky a jej významu na druhej strane. To má význam najmä v prípade kombinovanej štúdie chronickej toxicity a karcinogenity (kapitola B.33 tejto prílohy, odsek 12).

12. Treba zvážiť vykonanie kombinovanej štúdie chronickej toxicity a karcinogenity (kapitola B.33 tejto prílohy) namiesto samostatného vykonania štúdie chronickej toxicity (kapitola B.30 tejto prílohy) a štúdie karcinogenity (táto testovacia metóda B.32). Kombinovaným testom sa zabezpečí vyššia účinnosť, pokiaľ ide o čas a náklady, ako v prípade vykonania dvoch samostatných štúdií bez toho, aby sa znížila kvalita údajov, či už vo fáze chronickej toxicity alebo vo fáze karcinogenity. V prípade kombinovanej štúdie chronickej toxicity a karcinogenity (kapitola B.33 tejto prílohy) však treba náležite zohľadniť zásady výberu dávky (odseky 11 a 22 – 25), pričom sa takisto pripúšťa, že v určitých regulačných rámcoch sa môže vyžadovať vykonanie samostatných štúdií.

▼M4

13. Vymedzenie pojmov použitých v súvislosti s touto testovacou metódou je uvedené na konci tejto kapitoly a v usmerňovacom dokumente (GD) č. 116 (7).

PRINCÍP TESTU

14. Niekoľkým skupinám pokusných zvierat sa denne zvyčajne orálne podáva testovaná chemikália v odstupňovaných dávkach po väčšinu dĺžky ich života. Testovanie inhalačným alebo dermálnym spôsobom môže byť takisto vhodné. Na zvieratách sa dôkladne pozorujú príznaky toxicity a tvorba nádorových poškodení. Pitva sa uskutoční aj na zvieratách uhynutých alebo usmrtených počas testovania, tak aj po ukončení testu na zvieratách, ktoré test prežijú.

OPIS METÓDY

Výber druhov zvierat

15. Táto testovacia metóda primárne zahŕňa posudzovanie a vyhodnocovanie karcinogenity pri hlodavcoch (odsek 2). Použitie nehlodavcov sa môže zvážiť, ak z dostupných údajov vyplýva, že to má pre predpovedanie zdravotných účinkov u ľudí väčší význam. Výber druhu zvierat je potrebné odôvodniť. Najvhodnejším hlodavcom je potkan, hoci sa môžu použiť aj iné hlodavce, napr. myši. Hoci používanie myší pri testovaní karcinogenity môže mať obmedzený význam (24) (25) (26), niektoré súčasné regulačné programy stále vyžadujú testovanie karcinogenity na myšiach, pokiaľ sa nestanoví, že takáto štúdia nie je z vedeckého hľadiska potrebná. Potkany a myši sú uprednostňované pokusné modely vzhľadom na ich pomerne krátku dĺžku života, ich rozsiahle využívanie vo farmakologických a toxikologických štúdiách, ich náchylnosť na indukciu nádoru a dostupnosť dostatočne charakterizovaných kmeňov. Vzhľadom na tieto charakteristiky je k dispozícii veľké množstvo informácií o ich fyziológii a patológii. Ďalšie informácie o výbere druhov a kmeňa zvierat sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7).

16. Používajú sa mladé zdravé dospelé zvieratá bežne používaných laboratórnych kmeňov. Štúdia karcinogenity sa podľa možnosti vykonáva na zvieratách z toho istého kmeňa a zdroja, ako sú zvieratá použité v predbežnej štúdii/štúdiách toxicity v kratšom trvaní, hoci ak je známe, že pri zvieratách z tohto istého kmeňa a zdroja sa pri dlhodobých štúdiách problematicky dosahujú bežne akceptované kritériá prežitia [pozri usmerňovací dokument č. 116 (7)], je nutné zvážiť použitie kmeňa zvierat s prijateľnou mierou prežitia v dlhodobej štúdii. Používajú sa samice, ktoré nikdy nevrhli mláďatá a sú negravidné.

Umiestnenie a kŕmenie

17. Zvieratá môžu byť umiestnené jednotlivo alebo v malých skupinách rovnakého pohlavia v klietkach. Samostatné umiestnenie by sa malo zvážiť iba v prípade, že je to vedecky opodstatnené (27) (28) (29). Klietky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy vzhľadom na ich umiestnenie. Teplota pokusnej miestnosti, kde sú zvieratá umiestnené, by mala byť 22 °C (± 3 °C). Hoci relatívna vlhkosť by mala byť najmenej 30 % a podľa možnosti by nemala presiahnuť 70 %, okrem času čistenia miestnosti, cieľom by mala byť 50 – 60 % vlhkosť. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Potrava musí vyhovovať všetkým výživovým požiadavkám pre testované

▼M4

druhy zvierat a obsah kontaminantov potravy vrátane rezíduí pesticídov, perzistentných organických látok, fytoestrogénov, ťažkých kovov, mykotoxínov a iných kontaminantov, ktoré môžu mať vplyv na výsledky testu, musí byť čo najnižší. Analytické informácie o úrovni živín a kontaminantov potravy by sa mali získavať priebežne, aspoň na začiatku štúdie a pri zmene používanej šarže, a mali by sa uviesť v záverečnej správe. Podobne treba uviesť analytické informácie o pitnej vode použitej v štúdii. Výber krmiva môže byť ovplyvnený potrebou zabezpečiť vhodnú prímes testovanej chemikálie a potrebou splniť výživové požiadavky pri zvieratách v prípade, že sa testovaná chemikália podáva v potrave.

Príprava zvierat

18. Použijú sa zdravé zvieratá, ktoré sa aklimatizovali na laboratórne podmienky aspoň sedem dní a ktoré sa predtým nepodrobili iným pokusom. V prípade hlodavcov sa musí dávkovanie začať čo najskôr po odstavení mláďat a aklimatizácii a podľa možnosti skôr, než zvieratá dovŕšia vek ôsmich týždňov. Pokusné zvieratá sa charakterizujú na základe druhu, kmeňa, zdroja, pohlavia, hmotnosti a veku. Na začiatku štúdie má byť rozdiel medzi hmotnosťami použitých zvierat z každého pohlavia minimálny a pre každé pohlavie zvlášť nemá presahovať ± 20 % priemernej hmotnosti všetkých zvierat v štúdii. Zvieratá sa náhodne zadelia do kontrolných skupín a testovaných skupín. Po randomizácii by medzi jednotlivými skupinami v rámci každého pohlavia nemali byť výrazné rozdiely v priemernej telesnej hmotnosti. Ak existujú štatisticky významné rozdiely, randomizácia by sa podľa možnosti mala zopakovať. Každému zvieraťu sa pridelí jedinečné identifikačné číslo, ktorým sa zviera trvalo označí tetovaním, mikročipovým implantátom alebo inou vhodnou metódou.

POSTUP

Počet zvierat a ich pohlavie

19. Použijú sa obe pohlavia. Použije sa dostatočný počet zvierat, aby bolo možné dôkladné biologické a štatistické hodnotenie. V každej skupine s dávkou a v súbežnej kontrolnej skupine by preto malo byť minimálne 50 zvierat z každého pohlavia. V závislosti od cieľa štúdie je možné zvýšiť štatistickú významnosť kľúčových odhadov tak, že sa zvieratá nerovnomerne rozdelia do jednotlivých skupín s dávkami, pričom v skupinách s nízkou dávkou bude viac ako 50 zvierat, napr. pri odhadovaní karcinogénneho potenciálu pri nízkych dávkach. Treba však uznať, že miernym zvýšením počtu zvierat v skupine sa dosiahne pomerne nízke zvýšenie štatistickej významnosti štúdie. Ďalšie informácie o štatistickom plánovaní štúdie a výbere úrovní dávok s cieľom maximalizovať štatistickú významnosť sú k dispozícii v usmerňovacom dokumente č. 116 (7).

Zabezpečenie priebežného utrácania a satelitných (sentinelových) skupín

20. Ak je to vedecky opodstatnené, v štúdii sa môže počítať s priebežným utrácaním, napr. po 12 mesiacoch, s cieľom získať informácie o progresii nádorových zmien a mechanistické informácie. Ak už takéto informácie o testovanej chemikálii sú k dispozícii z predchádzajúcich štúdií toxicity v opakovaných dávkach, priebežné utrácanie zvierat nie je vedecky opodstatnené. Ak sa v rámci štúdie plánuje priebežné utrácanie zvierat, v každej skupine s dávkou, v ktorej sa plánuje utratenie, je zvyčajne desať zvierat z každého pohlavia, pričom celkový počet zvierat zahrnutých v pláne štúdie by sa mal zvýšiť o počet zvierat, ktoré majú byť utratené pred dokončením štúdie. Na monitorovanie stavu choroby možno počas štúdie v prípade potreby použiť ďalšiu skupinu sentinelových zvierat (zvyčajne päť zvierat z každého pohlavia) (30). Ďalšie usmernenia sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7).

▼M4

Skupiny s dávkami a dávkovanie

21. Usmernenia o všetkých aspektoch výberu dávky a odstupoch medzi jednotlivými úrovňami dávok sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7). Použijú sa aspoň tri veľkosti dávok a uskutoční sa paralelná kontrola. Úroveň dávky zvyčajne vychádza z výsledkov krátkodobejších štúdií v opakovaných dávkach alebo štúdií na zistenie rozsahu, pričom je potrebné prihliadať na existujúce toxikologické a toxikokinetické údaje, ktoré sú o testovanej chemikálii alebo príbuzných chemikáliách k dispozícii.

22. Pokiaľ to dovoľuje fyzikálno-chemický charakter alebo biologické účinky testovanej chemikálie, na identifikáciu hlavných cieľových orgánov a toxických účinkov by sa mala vybrať najvyššia úroveň dávky, ktorá súčasne nebude mať za následok utrpenie, závažnú toxicitu, morbiditu alebo uhynutie. Pri súčasnom zohľadnení faktorov uvedených v odseku 23 by sa mala zvyčajne vybrať najvyššia úroveň dávky preukazujúca toxicitu, o ktorej svedčí napríklad pokles prírastku telesnej hmotnosti (približne o 10 %). V závislosti od cieľov štúdie (pozri odsek 6) však možno vybrať najvyššiu dávku, ktorá je nižšia ako dávka preukazujúca toxicitu, napr. ak dávka vyvoláva daný nepriaznivý účinok, ktorý má však malý vplyv na dĺžku života alebo na telesnú hmotnosť.

23. Úrovne dávok a odstupy medzi úrovňami dávok možno vybrať s cieľom určiť vzťah medzi dávkou a reakciou a v závislosti od druhu pôsobenia testovanej chemikálie hladinu NOAEL alebo iný plánovaný výsledok štúdie, napr. BMD (pozri odsek 25) pri najnižšej úrovni dávky. Medzi faktory, ktoré by sa mali zvážiť pri podávaní nižších dávok, patrí predpokladaný sklon krivky závislosti reakcie od dávky, dávky, pri ktorých môže dochádzať k významným zmenám v metabolizme alebo druhu toxického pôsobenia, keď sa očakáva prahová hodnota alebo keď sa očakáva východisko na extrapoláciu nízkej dávky.

24. Vybraté odstupy medzi úrovňami dávok budú závisieť od vlastností testovanej chemikálie a nemožno ich v rámci tejto testovacej metódy predpísať, ale dobrá účinnosť testov sa často dosahuje, ak sa na stanovenie zostupného dávkovania použijú intervaly dávkovania s faktorom dva až štyri, pričom pridanie štvrtej pokusnej skupiny je často vhodnejšie ako používanie veľmi veľkých intervalov (napr. s faktorom vyšším ako 6 – 10) medzi dávkami. Vo všeobecnosti by sa nemali používať faktory vyššie ako 10 a v prípade, že sa použijú, je nutné tento postup odôvodniť.

25. Ako sa ďalej uvádza v usmerňovacom dokumente č. 116 (7), pri výbere dávky je potrebné zvážiť tieto body:

— známe alebo predpokladné nelinearity alebo inflexné body krivky závislosti reakcie od dávky,

— toxikokinetika a rozsahy dávok, pri ktorých dochádza alebo nedochádza k metabolickej indukcii, nasýteniu alebo nelinearite medzi externými a internými dávkami,

— prekurzorné poškodenia, markery účinkov alebo ukazovatele prebiehajúcich kľúčových základných biologických procesov,

— kľúčové (alebo predpokladané) aspekty druhu pôsobenia, ako sú dávky, pri ktorých začína vznikať cytotoxicita, narúšajú sa hormonálne hladiny, preťažujú sa homeostatické mechanizmy atď.,

▼M4

— oblasti krivky závislosti reakcie od dávky, kde je potrebný veľmi podrobný odhad, napr. v oblasti predpokladanej dávky BMD alebo predpokladanej prahovej úrovne,

— zváženie očakávaných úrovní expozície človeka.

26. Kontrolnou skupinou je skupina, ktorá nebola vystavená účinkom chemikálie, alebo skupina, ktorej sa podáva nosič, ak sa pri podávaní testovanej chemikálie používa nosič. So zvieratami v kontrolnej skupine sa musí zaobchádzať takisto ako so zvieratami v testovaných skupinách, s výnimkou aplikovania testovanej chemikálie. Ak sa použije nosič, kontrolná skupina dostane nosič v najvyššom objeme, aký bol použitý pri skupinách s dávkami. Ak sa testovaná chemikália podáva v potrave a vedie k výraznému zníženiu príjmu potravy v dôsledku zvýšeného nechutenstva, môže byť užitočné použiť ďalšiu súčasne kŕmenú kontrolnú skupinu, ktorá poslúži ako vhodnejšia kontrola.

Príprava dávok a podávanie testovanej chemikálie

27. Testovaná chemikália sa zvyčajne podáva orálne, v potrave alebo pitnej vode alebo cez sondu. Ďalšie informácie o spôsoboch a metódach podávania sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7). Spôsob a metóda podávania závisí od účelu štúdie, fyzikálno-chemických vlastností testovanej chemikálie, jej biodostupnosti a prevládajúceho spôsobu a metódy expozície u človeka. Vybratý spôsob a metódu podávania je potrebné odôvodniť. V záujme zabezpečenia dobrých životných podmienok pre zvieratá sa orálna sonda zvyčajne zvolí iba v prípade látok, pri ktorých spôsob a metóda podávania primerane reprezentuje potenciálnu expozíciu u človeka (napr. v prípade liekov). Potravinové alebo environmentálne chemikálie obsahujúce pesticídy sa zvyčajne podávajú v potrave alebo v pitnej vode. V určitých prípadoch, napr. v prípade expozície na pracovisku, však môže byť vhodnejšie podanie iným spôsobom.

28. Ak je to potrebné, testovaná chemikália sa rozpustí alebo suspenduje vo vhodnom nosiči. Náležitá pozornosť by sa mala venovať nasledujúcim vlastnostiam nosiča a ostatným aditívam: vplyv na absorpciu, distribúciu, metabolizmus alebo zadržiavanie testovanej chemikálie, vplyvy na chemické vlastnosti testovanej chemikálie, ktoré môžu zmeniť svoje toxické vlastnosti, vplyv na spotrebu potravy a vody alebo na stav výživy zvierat. Odporúča sa, aby sa vždy, keď je to možné, najskôr zvážilo použitie vodného roztoku/suspenzie, potom roztoku/emulzie v oleji (napr. kukuričný olej) a nakoniec prípadného roztoku v iných nosičoch. Charakteristiky toxicity iných nosičov ako voda musia byť známe. Musia byť k dispozícii informácie o stabilite testovanej chemikálie a homogenite dávkovacích roztokov alebo krmív (podľa potreby) v podmienkach podávania (napr. v potrave).

29. V prípade chemikálií podávaných v potrave alebo pitnej vode je dôležité zabezpečiť, aby množstvá použitej testovanej chemikálie neinterferovali s normálnou výživovou a vodnou bilanciou. V dlhodobých štúdiách toxicity, pri ktorých sa využíva podávanie v potrave, by koncentrácia testovanej chemikálie v krmive zvyčajne nemala presiahnuť horný limit 5 % z celkového množstva krmiva, aby sa zabránilo nutričnej nevyváženosti. Ak je testovaná chemikália podávaná v potrave, môže sa použiť buď konštantná stravná koncentrácia (mg/kg potravy alebo ppm), alebo konštantná úroveň dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť zvieraťa (mg/kg telesnej hmotnosti), ktorá sa vypočíta každý týždeň. Použitú alternatívu je potrebné špecifikovať.

▼M4

30. V prípade orálneho podávania sa zvieratám podávajú dávky testovanej chemikálie denne (sedem dní v týždni), v prípade hlodavcov zvyčajne počas 24 mesiacov (pozri aj odsek 32). Použitie každého iného režimu dávkovania, napr. päť dní v týždni, sa musí odôvodniť. V prípade podávania cez kožu sa zvieratám zvyčajne aplikuje testovaná chemikália najmenej šesť hodín denne, sedem dní v týždni, ako je uvedené v kapitole B.9 tejto prílohy (11), počas 24 mesiacov. Inhalačná expozícia sa vykonáva šesť hodín denne, sedem dní v týždni, ale ak je to odôvodnené, môže sa použiť aj expozícia počas piatich dní v týždni. Obdobie expozície zvyčajne trvá 24 mesiacov. Ak sa v prípade iných hlodavcov ako potkanov použije expozícia oblasti nosa, maximálne trvanie expozície je možné prispôsobiť s cieľom minimalizovať druhovo špecifické utrpenie. Ak sa použije expozícia v trvaní menej ako šesť hodín denne, treba uviesť odôvodnenie. Pozri aj kapitolu B.8 tejto prílohy (9).

31. Ak sa testovaná chemikália zvieratám podáva cez sondu, podáva sa prostredníctvom žalúdočnej sondy alebo vhodnej intubačnej kanyly približne v rovnakom čase každý deň. Zvyčajne sa podáva jedna dávka raz za deň. Ak je napríklad chemikália lokálne dráždivá, je možné zachovať dennú dávku tak, že sa rozdelí a podá v dvoch častiach (dvakrát denne). Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže jednorazovo podať, závisí od veľkosti pokusného zvieraťa. Objem by mal byť podľa možnosti čo najnižší a v prípade hlodavcov by zvyčajne nemal presahovať 1 ml/100 g telesnej hmotnosti (31). Zmeny v aplikovanom objeme sa minimalizujú tým, že sa koncentrácie upravia tak, aby sa zabezpečil stály objem vo všetkých dávkach. Výnimkou sú potenciálne žieravé alebo dráždivé chemikálie, ktoré je nutné zriediť, aby sa predišlo závažným lokálnym účinkom. Nemalo by sa testovať pri koncentráciách, ktoré sú pravdepodobne žieravé alebo dráždivé pre gastrointestinálny trakt.

Trvanie štúdie

32. Štúdia v prípade hlodavcov zvyčajne trvá 24 mesiacov, čo predstavuje väčšiu časť normálnej dĺžky života zvierat, ktoré sa majú použiť. V závislosti od dĺžky života kmeňa živočíšneho druhu v štúdii možno použiť aj kratšie alebo dlhšie trvanie, ale tento postup je nutné odôvodniť. V prípade určitých kmeňov myší, napr. kmeňov AKR/J, C3H/J alebo C57BL/6J, môže byť vhodná štúdia v trvaní 18 mesiacov. Nasledujúce informácie poskytujú usmernenia k trvaniu, ukončeniu štúdie a prežitiu. Ďalšie usmernenia vrátane úvah o prijateľnosti negatívnej štúdie karcinogenity v súvislosti s prežitím počas štúdie sú uvedené v Usmerňovacom dokumente OECD č. 116 o príprave a vykonávaní štúdií chronickej toxicity a karcinogenity (7).

— Ukončenie štúdie treba zvážiť, ak počet zvierat, ktoré prežili v skupinách s nižšou dávkou alebo v kontrolnej skupine, klesne pod 25 %.

— Ak v dôsledku toxicity predčasne uhynie iba skupina s vysokou dávkou, štúdia by sa nemala ukončiť.

— Prežitie sa pri jednotlivých pohlaviach posudzuje samostatne.

— Trvanie štúdie by nemalo presiahnuť hranicu, pri ktorej už údaje získané pomocou štúdie nepostačujú na vykonanie štatisticky platného vyhodnotenia.

▼M4

POZOROVANIA

33. Pri všetkých zvieratách si treba všímať morbiditu alebo mortalitu, zvyčajne na začiatku a na konci každého dňa vrátane víkendov a sviatkov. Pri zvieratách sa navyše denne kontrolujú špecifické príznaky, ktoré majú toxikologický význam, pričom sa zohľadňuje časový vrchol očakávaných účinkov po dávkovaní v prípade podávania cez sondu. Osobitnú pozornosť treba venovať tvorbe nádorov. Čas nástupu nádoru, lokalizáciu, rozmery, vzhľad a progresiu každého výrazne viditeľného alebo hmatateľného nádoru je nutné zaznamenať.

Telesná hmotnosť, spotreba potravy/vody a účinnosť krmiva

34. Všetky zvieratá sa odvážia na začiatku testu, najmenej raz týždenne počas prvých 13 týždňov a následne najmenej raz za mesiac. Spotreba potravy a účinnosť krmiva sa merajú najmenej raz za týždeň počas prvých 13 týždňov a následne najmenej raz za mesiac. Ak sa testovaná chemikália podáva vo vode na pitie, spotreba vody sa meria najmenej raz za týždeň počas prvých 13 týždňov a následne najmenej raz za mesiac. Merania spotreby vody by sa mali zvážiť aj v prípade štúdií, pri ktorých sa mení pitný režim.

Hematológia, klinická biochémia a iné merania

35. S cieľom maximalizovať informácie získané pomocou štúdie, najmä pokiaľ ide o úvahy týkajúce sa druhu pôsobenia, možno odobrať vzorky krvi na hematológiu a klinickú biochémiu, pričom rozhodnutie o tomto kroku ostáva na vedúcom štúdie. Takisto môže byť vhodné urobiť rozbor moču. Ďalšie usmernenia o význame odberu takýchto vzoriek v rámci štúdie karcinogenity sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7). Ak je to vhodné, odber vzoriek krvi na hematologické vyšetrenia, vyšetrenia klinickej biochémie a rozbor moču sa môže vykonať ako súčasť priebežného utrácania (odsek 20) a na konci štúdie pri minimálne desiatich zvieratách z každého pohlavia v každej skupine. Vzorky krvi sa odoberajú v anestézii zo stanoveného miesta, napríklad vpichom do srdca alebo zo zadnej očnicovej dutiny, a podľa možnosti sa uchovávajú v primeraných podmienkach. Takisto je možné na vyšetrenie pripraviť krvné stery, najmä ak sa zdá, že kostná dreň je cieľovým orgánom, hoci význam takéhoto vyšetrenia pri hodnotení karcinogénneho/onkogénneho potenciálu sa spochybňuje (32).

PATOLÓGIA

Makroskopická pitva

36. Všetky zvieratá v štúdii s výnimkou sentinelových zvierat (pozri odsek 20) a ostatných satelitných zvierat sa podrobujú kompletnej podrobnej makroskopickej pitve, ktorá zahŕňa dôkladné skúmanie vonkajšieho povrchu tela, všetkých telesných otvorov a lebečnej, hrudnej a brušnej dutiny a ich obsahu. Pri sentinelových a ostatných satelitných zvieratách môže byť v závislosti od konkrétneho prípadu potrebná pitva, o ktorej rozhodne vedúci štúdie. Orgánové hmotnosti väčšinou nie sú súčasťou štúdie karcinogenity, keďže geriatrické zmeny a v neskorších štádiách tvorba nádorov znehodnocujú užitočnosť údajov o orgánových hmotnostiach. Môžu však mať veľký význam pri hodnotení váhy dôkazov, najmä v rámci úvah o druhu pôsobenia. Ak sú súčasťou satelitnej štúdie, zozbierajú sa najneskôr do jedného roka od začatia štúdie.

▼M4

37. Tieto tkanivá by sa mali uchovávať v čo najvhodnejšom fixačnom médiu na obidva typy tkanív a na neskoršie histopatologické vyšetrenie (33) (vyšetrenia tkanív v hranatých zátvorkách sú nepovinné):

Všetky makroskopické poškodenia	srdce	pankreas	žalúdok (predný žalúdok, žľaznatý žalúdok)
nadoblička	ileum	prištítne teliesko	[zuby]
aorta	lačník	periférny nerv	semenníky
mozog (vrátane častí predného mozgu, mozočka a predĺženej miechy/mosta)	oblička	hypofýza	týmus
slepé črevo	slzná žľaza (extraorbitálna)	prostata	štítna žľaza
krčok maternice	pečeň	rektum	[jazyk]
koagulačná žľaza	pľúca	slinná žľaza	priedušnica
hrubé črevo	lymfatické uzliny (povrchové aj hlboké)	semenný mechúrik	močový mechúr
dvanástnik	prsná žľaza (povinné pri samiciach, a ak je zrejmé, že možno urobiť disekciu, aj pri samcoch)	kostrové svaly	maternica (vrátane krčka maternice)
nadsemenníky	[horný dýchací trakt vrátane nosa, nosových mušlí a prínosových dutín]	koža	[močovod]
oko (vrátane sietnice)	pažerák	miecha (na troch úrovniach: krčnej, hrudnej a lumbálnej)	[močová rúra]
[stehnová kosť s kĺbom]	[čuchový bulbus]	slezina	vagína
žlčník (v prípade iných druhov zvierat ako potkany)	vaječníky	[hrudná kosť]	prierez kostnej drene a/alebo čerstvý aspirát kostnej drene
Harderova žľaza			

V prípade párových orgánov, ako sú napríklad obličky a nadobličky, sa zachovajú obidva orgány. Z klinických a iných nálezov môže vyplynúť potreba vyšetrenia ďalších následných tkanív. Takisto by sa mali zachovať všetky orgány, ktoré vzhľadom na známe vlastnosti testovanej chemikálie možno považovať za cieľové orgány. V štúdiách, v ktorých sa chemikália podáva dermálne, je zoznam orgánov rovnaký ako v prípade orálneho podávania, pričom je nevyhnutný špecifický odber vzorky a zachovanie kože z miesta aplikácie chemikálie. V inhalačných štúdiách sa zoznam zachovaných a skúmaných tkanív dýchacieho traktu zostaví na základe odporúčaní kapitoly B.8 a kapitoly B.29 tejto prílohy. Pokiaľ ide o orgány/tkanivá (a popri špecificky uchovávaných tkanivách dýchacieho traktu), je potrebné vyšetriť tie isté orgány ako v prípade orálnej expozície.

▼M4

Histopatológia

38. K dispozícii sú usmernenia o dobrej praxi na vykonávanie štúdií toxikologickej patológie (33). Vyšetreniam sa podrobia minimálne tieto tkanivá:

— všetky tkanivá zo skupín s vysokou dávkou a kontrolných skupín,

— všetky tkanivá zo zvierat, ktoré uhynuli alebo boli utratené v priebehu štúdie,

— všetky tkanivá vykazujúce makroskopické abnormality vrátane nádorov,

— ak sú v skupine s vysokou dávkou pozorované histopatologické zmeny súvisiace s aplikáciou chemikálie, tie isté tkanivá sa vyšetria pri všetkých zvieratách zo všetkých skupín s odlišným dávkovaním,

— v prípade párových orgánov, ako sú napríklad obličky alebo nadobličky, sa vyšetria obidva orgány.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

39. Pri všetkých hodnotených parametroch sa uvedú údaje o jednotlivých zvieratách. Navyše všetky údaje sa musia zhrnúť v tabuľkovej forme, pričom ukazujú pre každú testovanú skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat uhynutých počas testu alebo usmrtených z humánnych dôvodov, čas uhynutia alebo humánneho usmrtenia jednotlivých zvierat, počet zvierat, pri ktorých sa prejavili známky toxicity, opis pozorovaných známok toxicity vrátane nábehu, času a prudkosti toxických účinkov, počet zvierat vykazujúcich poškodenie, typy poškodení a percentuálne množstvo zvierat, pri ktorých sa prejavil daný typ poškodenia. Zhrnuté údaje v tabuľkách musia okrem stupňa poškodení udávať priemer a smerodajnú odchýlku (v prípade priebežných údajov o teste) pri zvieratách vykazujúcich toxické účinky alebo poškodenia.

40. Pri interpretácii výsledkov štúdie môžu byť užitočné historické kontrolné údaje, napr. v prípade, ak existujú indikácie, že údaje získané v rámci súbežných kontrol sa výrazne odlišujú v porovnaní s novými údajmi pri kontrolných zvieratách z rovnakého testovacieho zariadenia/kolónie. V prípade hodnotenia historických kontrolných údajov by ich malo predložiť to isté laboratórium a mali by sa vzťahovať na zvieratá rovnakého veku a z toho istého kmeňa vytvoreného v priebehu piatich rokov, ktoré danej štúdii predchádzali.

41. Ak je to možné, numerické výsledky budú spracované vhodne a všeobecne uplatniteľnou metódou. Štatistické metódy a údaje, ktoré budú analyzované, sa vyberú počas plánovania štúdie (odsek 9). Výber musí v prípade potreby počítať s úpravami vzhľadom na prežitie.

Správa o teste

42. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— fyzikálny charakter, čistota a fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikačné údaje,

▼M4

— zdroj chemikálie,

— číslo šarže,

— certifikát chemickej analýzy.

Nosič (v prípade potreby):

— odôvodnenie výberu nosiča (ak je iný ako voda).

Testovacie zvieratá:

— použitý druh/kmeň a odôvodnenie výberu,

— počet, vek a pohlavie zvierat na začiatku testu,

— zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo atď.,

— hmotnosti jednotlivých zvierat na začiatku testu.

Podmienky testovania:

— odôvodnenie spôsobu podávania a výberu dávky,

— ak je to použiteľné, štatistické metódy použité na analýzu údajov,

— údaje o príprave testovanej chemikálie/krmiva,

— analytické údaje o dosiahnutej koncentrácii, stabilite a homogenite prípravku,

— spôsob podávania a údaje o podávaní testovanej chemikálie,

— v prípade inhalačných štúdií, či ide o expozíciu oblasti nosa alebo expozíciu celého tela,

— skutočné dávky (mg/kg telesnej hmotnosti/deň), faktor konverzie z potravy/pitnej vody, koncentrácia testovanej chemikálie (mg/kg alebo ppm), ak je to použiteľné,

— údaje o kvalite potravy a vody.

Výsledky (predloží sa tabuľkové zhrnutie údajov a údaje o jednotlivých zvieratách)

Všeobecné informácie:

— údaje o prežití,

— telesná hmotnosť a zmeny telesnej hmotnosti,

— spotreba potravy, výpočty účinnosti krmiva, pokiaľ sa vykonali, a spotreba vody, ak je to použiteľné,

— toxikokinetické údaje (ak sú dostupné),

— oftalmoskopia (ak je dostupná),

— hematológia (ak je dostupná),

— klinická chémia (ak je dostupná).

▼M4

Klinické nálezy:

— príznaky toxicity,

— rozsah (a ak sa hodnotí, závažnosť) každej abnormality,

— povaha, závažnosť a trvanie klinických pozorovaní (či už prechodných alebo stálych).

Údaje o pitve:

— konečná telesná hmotnosť,

— orgánové hmotnosti a ich pomery, ak je to použiteľné,

— pitevné nálezy, rozsah a závažnosť abnormalít.

Histopatológia:

— nenádorové histopatologické nálezy,

— nádorové histopatologické nálezy,

— korelácia medzi makroskopickými a mikroskopickými nálezmi,

— podrobný opis všetkých histopatologických nálezov súvisiacich s aplikáciou chemikálie vrátane stupňa závažnosti,

— správa o všetkých partnerských hodnoteniach preparátov (sklíčok).

Štatistické spracovanie výsledkov v prípade potreby

Rozbor výsledkov zahŕňajúci:

— rozbor všetkých prístupov modelovania,

— vzťahy medzi dávkou a reakciou,

— historické kontrolné údaje,

— zváženie všetkých informácií o druhu pôsobenia,

— stanovenie BMD, NOAEL alebo LOAEL,

— význam pre človeka.

Závery

LITERATÚRA

1. OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rím, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paríž.

2. EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

3. Combes, R. D., Gaunt, I., Balls, M. (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163 – 208.

4. Barlow, S. M., Greig, J. B., Bridges, J. W., a kol. (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145 – 191.

5. Chhabra, R. S., Bucher, J. R., Wolfe, M., Portier, C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437 – 445.

▼M4

6. Kapitola B.27 tejto prílohy, Test subchronickej orálnej toxicity: opakovaná 90-dňová štúdia orálnej toxicity u nehlodavcov.

7. OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 a 453 – druhé vydanie. Series on Testing and Assessment No. 116, dostupné na verejnej webovej stránke OECD s usmerneniami na vykonávanie testov na adrese www.oecd.org/env/testguidelines.

8. OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paríž.

9. Kapitola B.8 tejto prílohy, Subakútna inhalačná toxicita: 28-dňová štúdia.

10. Kapitola B.29 tejto prílohy, Subchronická inhalačná toxicita: 90-dňová štúdia.

11. Kapitola B.9 tejto prílohy, Toxicita po 28–dňovej opakovanej dávke (dermálna).

12. Boobis, A. R., Cohen, S. M., Dellarco, V., McGregor, D., Meek, M. E., Vickers, C., Willcocks, D., Farland, W. (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36: 793 – 801.

13. Cohen, S. M., Meek, M. E., Klaunig, J. E., Patton, D. E., a Fenner-Crisp, P. A. (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33: 581 – 589.

14. Holsapple, M. P., Pitot, H. C., Cohen, S. N., Boobis, A. R., Klaunig, J. E., Pastoor, T., Dellarco, V. L., Dragan, Y. P. (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89: 51 – 56.

15. Meek, E. M., Bucher, J. R., Cohen, S. M., Dellarco, V., Hill, R. N., Lehman-McKemmon, L. D., Longfellow, D. G., Pastoor, T., Seed, J., Patton, D. E. (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33: 591 – 653.

16. Carmichael, N. G., Barton, H. A., Boobis, A. R., a kol. (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1 – 7.

17. Barton, H. A., Pastoor, T. P., Baetcke, T. a kol. (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9 – 35.

18. Doe, J. E., Boobis, A. R., Blacker, A., a kol. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37 – 68.

19. Cooper, R. L., Lamb, J. S., Barlow, S. M., a kol. (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 69 – 98.

20. OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paríž.

21. OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paríž.

▼M4

22. Rhomberg, L. R., Baetcke, K., Blancato, J., Bus, J., Cohen, S., Conolly, R., Dixit, R., Doe, J., Ekelman, K., Fenner-Crisp, P., Harvey, P., Hattis, D., Jacobs, A., Jacobson-Kram, D., Lewandowski, T., Liteplo, R., Pelkonen, O., Rice, J., Somers, D., Turturro, A., West, W., Olin, S. (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 – 837.

23. ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran, J. A. (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

24. Griffiths, S. A., Parkinson, C., McAuslane, J. A. N., a Lumley, C. E. (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1): 214.

25. Usui, T., Griffiths, S. A., a Lumley, C. E. (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy P. O. F. & Harron D. W. G. (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. s. 279 – 284.

26. Carmichael, N. G., Enzmann, H., Pate, I., Waechter, F. (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect. 105: 1196 – 1203.

27. Smernica Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ z 22. septembra 2012 o ochrane zvierat používaných na vedecké účely, Ú. v. EÚ L 276, 20.10.2010, s. 33.

28. National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington, D.C., US Dept. of Health and Human Services.

29. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 1988). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-04-2.

30. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

31. Diehl, K.-H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J.-M., van de Vorstenbosch, C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology 21: 15 – 23.

32. Weingand, K. a kol. (1996). Harmonization of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fund. Appl. Toxicol. 29: 198 – 201.

33. Crissman, J., Goodman, D., Hildebrandt, P. a kol. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126 – 131.

▼**M4**

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMU

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

▼M4

B. 33. KOMBINOVANÁ ŠTÚDIA CHRONICKEJ TOXICITY/KARCINOGENITY

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s Usmerneniami OECD na vykonávanie testov (TG) 453 (2009). Pôvodné usmernenia TG 453 boli prijaté v roku 1981. Vypracovanie tejto aktualizovanej testovacej metódy B.33 sa považovalo za potrebné na zohľadnenie najnovšieho vývoja v oblasti starostlivosti o zvieratá a regulačných požiadaviek (1) (2) (3) (4) (5). Aktualizácia tejto testovacej metódy B.33 bola vykonaná súbežne s revíziou kapitoly B.32 tejto prílohy, Štúdie karcinogenity, a kapitoly B.30 tejto prílohy, Štúdie chronickej toxicity, s cieľom získať ďalšie informácie pomocou zvierat použitých v štúdii a poskytnúť ďalšie podrobné údaje o výbere dávky. Táto testovacia metóda je vypracovaná na testovanie širokej škály chemikálií vrátane pesticídov a priemyselných chemikálií. Treba však poznamenať, že v prípade liekov sa niektoré podrobnosti a požiadavky môžu líšiť (pozri usmernenia S1B Medzinárodnej konferencie o zosúladení (ICH) o testovaní karcinogenity liekov).

2. Väčšina štúdií chronickej toxicity a karcinogenity sa vykonáva na hlodavcoch a táto testovacia metóda sa preto primárne vzťahuje na štúdie vykonávané na týchto živočíšnych druhoch. Ak sa takéto štúdie budú vyžadovať v prípade nehlodavcov, takisto sa s príslušnými úpravami môžu uplatniť uvedené princípy a postupy spolu s princípmi a postupmi uvedenými v kapitole B.27 tejto prílohy, 90-dňová štúdia orálnej toxicity pri nehlodavcoch v opakovaných dávkach (6), ako sa uvádza v Usmerňovacom dokumente OECD č. 116 o príprave a vykonávaní štúdií chronickej toxicity a karcinogenity (7).

3. Tri hlavné spôsoby podávania používané v štúdiách chronickej toxicity/karcinogenity sú orálne, dermálne a inhalačné podávanie. Výber spôsobu podávania závisí od fyzikálnych a chemických vlastností testovanej chemikálie a najčastejšieho spôsobu expozície u človeka. Ďalšie informácie o výbere spôsobu expozície sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7).

4. Táto testovacia metóda je zameraná na orálnu expozíciu, ktorá sa v štúdiách chronickej toxicity a karcinogenity používa najčastejšie. Hoci dlhodobé štúdie využívajúce dermálnu alebo inhalačnú expozíciu môžu byť takisto potrebné na hodnotenie zdravotných rizík pre človeka a/alebo sa môžu vyžadovať v určitých regulačných režimoch, oba spôsoby expozície sú do značnej miery technicky zložité. Takéto štúdie budú musieť byť pripravené v závislosti od jednotlivých prípadov, hoci testovacia metóda, ktorá sa tu uvádza na posudzovanie a vyhodnocovanie chronickej toxicity a karcinogenity pri orálnom podávaní, by mohla slúžiť ako základ protokolu pre inhalačné a/alebo dermálne štúdie vzhľadom na odporúčania týkajúce sa období testovania, klinických a patologických parametrov atď. K dispozícii sú usmernenia OECD o podávaní testovaných chemikálií inhalačným (7) (8) a dermálnym spôsobom (7). Pri príprave dlhodobejších štúdií zahŕňajúcich inhalačnú expozíciu je nutné si preštudovať najmä kapitolu B.8 tejto prílohy (9) a kapitolu B.29 tejto prílohy (10) spolu s Usmerňovacím dokumentom OECD o testovaní akútnej inhalačnej toxicity (8). Kapitolu B.9 tejto prílohy (11) je nutné konzultovať v prípade testovania dermálnej expozície.

▼M4

5. Kombinovaná štúdia chronickej toxicity/karcinogenity poskytuje informácie o možnej nebezpečnosti pre zdravie, ktorá sa pravdepodobne vyskytne pri opakovanej expozícii v priebehu celej dĺžky života použitého živočíšneho druhu. Štúdia poskytne informácie o toxických účinkoch testovanej chemikálie vrátane potenciálnej karcinogenity, indikuje cieľové orgány a možnosť akumulácie. Môže zabezpečiť odhad hladiny bez pozorovaného nepriaznivého účinku pre toxické účinky a v prípade negenotoxických karcinogénov pre reakcie na nádory, ktorý možno použiť na stanovenie bezpečnostných kritérií týkajúcich sa expozície človeka. Takisto sa v nej zdôrazňuje nutnosť dôkladných klinických pozorovaní zvierat s cieľom získať čo najväčšie množstvo informácií.

6. Medzi ciele štúdie chronickej toxicity/karcinogenity v rámci tejto testovacej metódy patrí:

— identifikácia karcinogénnych vlastností testovanej chemikálie, ktoré vedú k zvýšenému výskytu nádorov, zvýšenému podielu zhubných nádorov alebo k skráteniu času do výskytu nádorov v porovnaní so súbežnými kontrolnými skupinami,

— identifikácia času do výskytu nádorov,

— identifikácia chronickej toxicity testovanej chemikálie,

— identifikácia cieľových orgánov chronickej toxicity a karcinogenity,

— charakterizácia vzťahu medzi dávkou a reakciou,

— identifikácia hladiny bez pozorovaného nepriaznivého účinku (NOAEL) alebo východiska na stanovenie porovnávacej dávky (BMD),

— extrapolácia karcinogénnych účinkov na úrovne expozície človeka pri nízkych dávkach,

— predpovedanie účinkov chronickej toxicity na úrovniach expozície človeka,

— poskytnutie údajov na testovanie hypotéz týkajúcich sa druhu pôsobenia (2) (7) (12) (13) (14) (15).

ÚVODNÉ ÚVAHY

7. Pri posudzovaní a vyhodnocovaní potenciálnej karcinogenity a chronickej toxicity testovanej chemikálie testovacie laboratórium pred vykonaním štúdie zváži všetky dostupné informácie o testovanej chemikálii s cieľom zamerať prípravu štúdie na účinnejšie testovanie jej toxikologických vlastností a minimalizovať využívanie zvierat. Informácie a úvahy o druhu pôsobenia podozrivého karcinogénu (2)(7) (12) (13) (14) (15) sú mimoriadne dôležité, lebo optimálne plánovanie sa môže líšiť v závislosti od toho, či je testovaná chemikália známym alebo podozrivým genotoxickým karcinogénom. Ďalšie usmernenia k úvahám o druhu pôsobenia sú uvedené v usmerňovacom dokumente č.116 (7).

8. Informácie, ktoré pomôžu pri príprave štúdie, zahŕňajú identitu, chemickú štruktúru a fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej chemikálie, akékoľvek informácie o druhu pôsobenia, výsledky všetkých testov toxicity *in vitro* alebo *in vivo* vrátane testov genotoxicity, predpokladané použitie (použitia) a potenciál pre expozíciu ľudí, dostupné údaje (Q)SAR, údaje o mutagenite/genotoxicite a iné toxikologické údaje o štrukturálne príbuzných chemikáliách, dostupné toxikokinetické údaje (kinetika pri jednej dávke a takisto pri opakovaných dávkach, ak je k dispozícii) a údaje získané

▼M4

z iných štúdií opakovanej expozície. Stanovenie chronickej toxicity/karcinogenity sa vykoná až po získaní prvotných informácií o toxicite z 28-dňového a/alebo 90-dňového testu toxicity v opakovaných dávkach. Krátkodobé testy nástupu a šírenia rakoviny by takisto mohli priniesť užitočné informácie. Stratégiu fázového testovania pri testovaní karcinogenity treba zvážiť ako súčasť celkového hodnotenia potenciálnych nepriaznivých zdravotných účinkov danej testovanej chemikálie (16) (17) (18) (19).

9. Štatistické metódy, ktoré sú vzhľadom na prípravu pokusu a ciele na analýzu výsledkov najprimeranejšie, sa stanovia pred začatím štúdie. Je potrebné zvážiť, či by štatistiky nemali zahŕňať úpravu vzhľadom na prežitie zvierat, analýzu kumulatívnych nádorových rizík súvisiacich s dĺžkou prežitia, analýzu času do progresie nádoru a analýzu v prípade predčasného konca jednej alebo viacerých skupín. Usmernenia o vhodných štatistických analýzach a kľúčové odkazy na medzinárodne uznávané štatistické metódy sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7), ako aj v Usmerňovacom dokumente č. 35 o analýze a hodnotení štúdií chronickej toxicity a karcinogenity (20).

10. Pri vykonávaní štúdie karcinogenity je vždy nutné sa riadiť hlavnými zásadami a úvahami uvedenými v Usmerňovacom dokumente OECD o rozpoznaní, hodnotení a použití klinických príznakov ako humánnych parametrov pre pokusné zvieratá používané pri hodnotení bezpečnosti (21), najmä v odseku 62. V tomto odseku sa uvádza, že „ak v štúdiách s opakovanými dávkami zviera vykazuje klinické príznaky, ktoré sú progresívne a vedú k ďalšiemu zhoršeniu stavu, je potrebné na základe informácií rozhodnúť, či sa má zviera humánne usmrtiť alebo nie. Pri rozhodovaní treba zvážiť hodnotu informácií, ktoré by sa získali ďalším udržiavaním zvieraťa pri živote v rámci štúdie, v spojitosti s jeho celkovým stavom. Ak sa prijme rozhodnutie, že testovanie zvieraťa bude pokračovať, frekvencia pozorovaní by sa mala podľa potreby zvýšiť. Takisto je možné, bez toho, aby to malo negatívny vplyv na účel testu, dočasne pozastaviť podávanie dávok, ak sa tým zvieraťu uľaví od bolesti alebo utrpenia, alebo znížiť testovaciu dávku.“

11. Podrobné usmernenia a rozbor zásad výberu dávky v štúdiách chronickej toxicity a karcinogenity sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7), ako aj v dvoch publikáciách Medzinárodného inštitútu prírodných vied (International Life Sciences Institute) (22) (23). Základná stratégia výberu dávky závisí od primárneho cieľa alebo cieľov štúdie (odsek 6). Pri výbere vhodných úrovní dávky je potrebné dosiahnuť rovnováhu medzi skríningom nebezpečnosti na jednej strane a charakterizáciou reakcie na nízke dávky a jej významu na druhej strane. To je v prípade tejto kombinovanej štúdie chronickej toxicity a karcinogenity veľmi dôležité.

12. Treba zvážiť vykonanie tejto kombinovanej štúdie chronickej toxicity a karcinogenity namiesto samostatného vykonania štúdie chronickej toxicity (kapitola B.30 tejto prílohy) a štúdie karcinogenity (kapitola B.32 tejto prílohy). Kombinovaným testom sa zabezpečí vyššia účinnosť, pokiaľ ide o čas a náklady, a o niečo menšie využívanie zvierat ako v prípade vykonania dvoch samostatných štúdií bez toho, aby sa znížila kvalita údajov, či už vo fáze chronickej toxicity alebo vo fáze karcinogenity. V prípade kombinovanej štúdie chronickej toxicity a karcinogenity však treba náležite zohľadniť zásady výberu dávky (odseky 11 a 22 – 26), pričom sa takisto pripúšťa, že v určitých regulačných rámcoch sa môže vyžadovať vykonanie samostatných štúdií. Ďalšie usmernenia o príprave kombinovanej štúdie chronickej toxicity a karcinogenity s cieľom dosiahnuť maximálnu účinnosť štúdie v súvislosti s možnosťami zníženia počtu použitých zvierat, ako aj prostredníctvom zefektívnenia jednotlivých experimentálnych postupov sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7).

▼M4

13. Vymedzenie pojmov použitých v súvislosti s touto testovacou metódou je uvedené na konci tejto kapitoly a v usmerňovacom dokumente (GD) č. 116 (7).

PRINCÍP TESTU

14. Plán štúdie pozostáva z dvoch paralelných fáz, fázy chronickej toxicity a fázy karcinogenity (ich trvania sú uvedené v odsekoch 34 a 35). Testovaná chemikália sa zvyčajne podáva orálne, aj keď môže byť vhodné aj testovanie inhalačnej alebo dermálnej expozície. Počas fázy chronickej toxicity sa testovaná chemikália podáva denne v odstupňovaných dávkach niekoľkým skupinám testovacích zvierat (jedna úroveň dávky na skupinu), zvyčajne počas 12 mesiacov, hoci v závislosti od regulačných požiadaviek možno zvoliť aj dlhšie alebo kratšie obdobia (pozri odsek 34). Vybraté obdobie by malo byť dostatočne dlhé, aby sa mohli prejaviť účinky kumulatívnej toxicity, ale bez toho, aby testovanie zmarili zmeny súvisiace so starnutím zvierat. Plán štúdie môže zahŕňať aj jedno alebo viaceré priebežné utratenia, napr. po troch a šiestich mesiacoch, pričom na doplnenie počtu je možné použiť ďalšie skupiny zvierat (pozri odsek 20). Počas fázy karcinogenity sa testovaná chemikália podáva denne niekoľkým skupinám testovacích zvierat po väčšinu dĺžky ich života. Na zvieratách sa v oboch fázach dôkladne pozorujú príznaky toxicity a tvorba nádorových poškodení. Pitva sa uskutoční na zvieratách uhynutých alebo usmrtených počas testovania, ako aj po ukončení testu na zvieratách, ktoré test prežijú.

OPIS METÓDY

Výber druhov zvierat

15. Táto testovacia metóda primárne zahŕňa posudzovanie a vyhodnocovanie chronickej toxicity karcinogenity pri hlodavcoch (odsek 2). Použitie nehlodavcov sa môže zvážiť, ak z dostupných údajov vyplýva, že to má pre predpovedanie zdravotných účinkov u ľudí väčší význam. Výber druhu zvierat je potrebné odôvodniť. Najvhodnejším hlodavcom je potkan, hoci sa môžu použiť aj iné hlodavce, napr. myši. Hoci používanie myší pri testovaní karcinogenity môže mať obmedzený význam (24) (25) (26), niektoré súčasné regulačné programy stále vyžadujú testovanie karcinogenity na myšiach, pokiaľ sa nestanoví, že takáto štúdia nie je z vedeckého hľadiska potrebná. Potkany a myši sú uprednostňované pokusné modely vzhľadom na ich relatívne krátku dĺžku života, ich rozsiahle využívanie vo farmakologických a toxikologických štúdiách, ich náchylnosť na indukciu nádoru a dostupnosť dostatočne charakterizovaných kmeňov. Vzhľadom na tieto charakteristiky je k dispozícii veľké množstvo informácií o ich fyziológii a patológii. Príprava a vykonanie štúdií chronickej toxicity/karcinogenity pri nehlodavcoch, ak sa požadujú, by mali byť založené na zásadách uvedených v tejto testovacej metóde, ako aj na zásadách uvedených v kapitole B.27 tejto prílohy, 90-dňová štúdia orálnej toxicity pri nehlodavcoch v opakovaných dávkach (6). Ďalšie informácie o výbere druhov a kmeňa zvierat sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7).

16. Používajú sa mladé zdravé dospelé zvieratá bežne používaných laboratórnych kmeňov. Kombinovaná štúdia chronickej toxicity/karcinogenity sa vykonáva na zvieratách z toho istého kmeňa a zdroja, ako sú zvieratá použité v predbežnej štúdii (štúdiách) toxicity v kratšom trvaní, hoci ak je známe, že pri zvieratách z tohto istého kmeňa a zdroja sa pri dlhodobých štúdiách problematicky dosahujú bežne akceptované kritériá prežitia [pozri usmerňovací dokument č. 116 (7)], je nutné zvážiť použitie kmeňa zvierat s prijateľnou mierou prežitia v dlhodobej štúdii. Používajú sa samice, ktoré nikdy nevrhli mláďatá a sú negravidné.

▼M4

Podmienky umiestnenia a kŕmenia

17. Zvieratá môžu byť umiestnené jednotlivo alebo v malých skupinách rovnakého pohlavia v klietkach. Samostatné umiestnenie by sa malo zvážiť iba v prípade, že je to vedecky opodstatnené (27) (28) (29). Klietky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy vzhľadom na ich umiestnenie. Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 °C (± 3 °C). Hoci relatívna vlhkosť by mala byť najmenej 30 % a prednostne by nemala presiahnuť 70 %, okrem času čistenia miestnosti, cieľom by mala byť 50 – 60 % vlhkosť. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Potrava musí vyhovovať všetkým výživovým požiadavkám pre testované druhy zvierat a obsah kontaminantov potravy vrátane rezíduí pesticídov, perzistentných organických látok, fytoestrogénov, ťažkých kovov, mykotoxínov a iných kontaminantov, ktoré môžu mať vplyv na výsledky testu, musí byť čo najnižší. Analytické informácie o úrovni živín a kontaminantov potravy by sa mali získavať priebežne, aspoň na začiatku štúdie a pri zmene používanej šarže, a mali by sa uviesť v záverečnej správe. Podobne treba uviesť analytické informácie o pitnej vode použitej v štúdii. Výber krmiva môže byť ovplyvnený potrebou zabezpečiť vhodnú prímes testovanej chemikálie a potrebou splniť výživové požiadavky pri zvieratách v prípade, že sa testovaná chemikália podáva v potrave.

Príprava zvierat

18. Použijú sa zdravé zvieratá, ktoré sa aklimatizovali na laboratórne podmienky aspoň sedem dní a ktoré sa predtým nepodrobili iným pokusom. V prípade hlodavcov sa musí dávkovanie začať čo najskôr po odstavení mláďat a aklimatizácii a podľa možnosti skôr, než zvieratá dovŕšia vek ôsmich týždňov. Pokusné zvieratá sa charakterizujú na základe druhu, kmeňa, zdroja, pohlavia, hmotnosti a veku. Na začiatku štúdie má byť rozdiel medzi hmotnosťami použitých zvierat z každého pohlavia minimálny a pre každé pohlavie zvlášť nemá presahovať ± 20 % priemernej hmotnosti všetkých zvierat v štúdii. Zvieratá by mali byť postupne zadelené do kontrolných a testovaných skupín. Po randomizácii by medzi jednotlivými skupinami v rámci každého pohlavia nemali byť výrazné rozdiely v priemernej telesnej hmotnosti. Ak existujú štatisticky významné rozdiely, randomizácia by sa podľa možnosti mala zopakovať. Každému zvieraťu sa pridelí jedinečné identifikačné číslo, ktorým sa zviera trvalo označí tetovaním, mikročipovým implantátom alebo inou vhodnou metódou.

POSTUP

Počet zvierat a ich pohlavie

19. Použijú sa obe pohlavia. Použije sa dostatočný počet zvierat, aby bolo možné dôkladné biologické a štatistické hodnotenie. V prípade hlodavcov by preto v každej skupine s dávkou (ako sa uvádza v odseku 22) a v súbežnej kontrolnej skupine určenej pre fázu karcinogenity tejto štúdie malo byť minimálne 50 zvierat z každého pohlavia. V závislosti od cieľa štúdie je možné zvýšiť štatistickú významnosť kľúčových odhadov tak, že sa zvieratá nerovnomerne rozdelia do jednotlivých skupín s dávkami, pričom v skupinách s nízkou dávkou bude viac ako 50 zvierat, napr. pri odhadovaní karcinogénneho potenciálu pri nízkych dávkach. Treba však uznať, že miernym zvýšením počtu zvierat v skupine sa dosiahne pomerne nízke zvýšenie štatistickej významnosti štúdie. V každej skupine s dávkou (ako sa uvádza v odseku 22) a v súbežnej kontrolnej skupine určenej pre fázu

▼M4

chronickej toxicity štúdie by v prípade hlodavcov malo byť minimálne desať zvierat z každého pohlavia. Treba poznamenať, že tento počet je nižší ako pri štúdii chronickej toxicity (kapitola B.30 tejto prílohy). Interpretácia údajov zo zníženého počtu zvierat v skupine vo fáze chronickej toxicity tejto kombinovanej štúdie však bude podložená údajmi z väčšieho počtu zvierat vo fáze karcinogenity štúdie. V štúdiách, v ktorých sa využívajú myši, môže byť na uskutočnenie všetkých požadovaných hematologických vyšetrení potrebné vo fáze chronickej toxicity použiť v každej skupine s dávkou viac zvierat. Ďalšie informácie o štatistickom plánovaní štúdie a výbere úrovní dávok s cieľom maximalizovať štatistickú významnosť sú k dispozícii v usmerňovacom dokumente č. 116 (7).

Zabezpečenie priebežného utrácania, satelitnej skupiny a sentinelových zvierat

20. Ak je to vedecky opodstatnené, v štúdii sa môže počítať s priebežným utrácaním, napr. po šiestich mesiacoch pre fázu chronickej toxicity, s cieľom získať informácie o progresii nenádorových zmien a mechanistické informácie. Ak už takéto informácie o testovanej chemikálii sú k dispozícii z predchádzajúcich štúdií toxicity v opakovaných dávkach, priebežné utrácanie zvierat nie je vedecky opodstatnené. Zvieratá použité vo fáze chronickej toxicity štúdie, zvyčajne v trvaní 12 mesiacov (odsek 34), poskytujú údaje o priebežnom utrácaní pre fázu karcinogenity štúdie, čím sa dosiahne zníženie celkového počtu použitých zvierat. Vo fáze chronickej toxicity štúdie možno použiť aj satelitné skupiny na monitorovanie reverzibility akýchkoľvek toxikologických zmien spôsobených skúmanou testovanou chemikáliou. Tieto skupiny sa môžu obmedzovať na najvyššiu úroveň dávky v štúdii a na kontrolu. Na monitorovanie stavu choroby možno počas štúdie v prípade potreby použiť ďalšiu skupinu sentinelových zvierat (zvyčajne päť zvierat z každého pohlavia) (30). Ďalšie usmernenia o príprave štúdie s cieľom zahrnúť priebežné utrácanie, satelitné a sentinelové zvieratá a súčasne minimalizovať celkový počet použitých zvierat sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7).

21. Ak sa v rámci štúdie plánuje použitie satelitných zvierat a/alebo priebežné utrácanie zvierat, v každej skupine s dávkou zahrnutej na tento účel je zvyčajne desať zvierat z každého pohlavia, pričom celkový počet zvierat zahrnutých v pláne štúdie by sa mal zvýšiť o počet zvierat, ktoré majú byť utratené pred dokončením štúdie. Priebežne utratené zvieratá a satelitné zvieratá sa zvyčajne podrobia tým istým pozorovaniam vrátane pozorovaní telesnej hmotnosti, spotreby potravy/vody, hematologickým meraniam a meraniam klinickej biochémie a patologickým vyšetreniam ako zvieratá vo fáze chronickej toxicity v rámci základnej štúdie, hoci sa takisto môže zabezpečiť, aby sa (v skupinách, v ktorých sa plánuje priebežné utrácanie zvierat) merania obmedzili na špecifické kľúčové ukazovatele, ako je neurotoxicita alebo imunotoxicita.

Skupiny s dávkami a dávkovanie

22. Usmernenia o všetkých aspektoch výberu dávky a odstupoch medzi jednotlivými úrovňami dávok sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7). Pre fázu chronickej toxicity aj fázu karcinogenity sa použijú aspoň tri veľkosti dávok a vykoná sa paralelná kontrola. Úroveň dávky zvyčajne vychádza z výsledkov krátkodobých štúdií v opakovaných dávkach alebo štúdií na zistenie rozsahu, pričom je potrebné prihliadať na existujúce toxikologické a toxikokinetické údaje, ktoré sú o testovanej chemikálii alebo príbuzných chemikáliách k dispozícii.

▼M4

23. Pre fázu chronickej toxicity štúdie nemusí byť potrebné vykonať kompletnú štúdiu s využitím troch úrovní dávok, ak sa predpokladá, že test pri jednej úrovni dávky zodpovedajúcej najmenej 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň pravdepodobne nespôsobí nepriaznivé účinky. Toto rozhodnutie musí byť založené na informáciách z predbežných štúdií a zvážení skutočnosti, že podľa údajov o štrukturálne príbuzných chemikáliách sa toxicita neočakáva. Uplatňuje sa limit 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň s výnimkou prípadu, keď expozícia človeka indikuje potrebu použitia vyššej úrovne dávky.

24. Pokiaľ to dovoľuje fyzikálno-chemický charakter alebo biologické účinky testovanej chemikálie, na identifikáciu hlavných cieľových orgánov a toxických účinkov by sa mala vybrať najvyššia úroveň dávky, ktorá súčasne nebude mať za následok utrpenie, závažnú toxicitu, morbiditu alebo uhynutie. Zvyčajne sa vyberie najvyššia úroveň dávky preukazujúca toxicitu, o ktorej svedčí napríklad pokles prírastku telesnej hmotnosti (o približne 10 %). V závislosti od cieľov štúdie (pozri odsek 6) však možno vybrať najvyššiu dávku, ktorá je nižšia ako dávka preukazujúca toxicitu, napr. ak dávka vyvoláva daný nepriaznivý účinok, ktorý má však malý vplyv na dĺžku života alebo na telesnú hmotnosť.

25. Úrovne dávok a odstupy medzi úrovňami dávok možno vybrať s cieľom určiť vzťah medzi dávkou a reakciou a v závislosti od druhu pôsobenia testovanej chemikálie hladinu NOAEL alebo iný plánovaný výsledok štúdie, napr. BMD (pozri odsek 27). Medzi faktory, ktoré by sa mali zvážiť pri podávaní nižších dávok, patrí predpokladaný sklon krivky závislosti reakcie od dávky, dávky, pri ktorých môže dochádzať k významným zmenám v metabolizme alebo druhu toxického pôsobenia, keď sa očakáva prahová hodnota alebo keď sa očakáva východisko pre extrapoláciu nízkej dávky. Pri kombinovanej štúdii karcinogenity/chronickej toxicity je primárnym cieľom získať informácie na účely hodnotenia rizika karcinogenity, pričom informácie o chronickej toxicite sú zvyčajne vedľajším cieľom. Tento fakt treba mať pri výbere úrovní dávok a odstupov medzi úrovňami dávok v štúdii na pamäti.

26. Vybraté odstupy medzi úrovňami dávok budú závisieť od cieľov štúdie a vlastností testovanej chemikálie a nemožno ich v rámci tejto testovacej metódy podrobne predpísať, ale dobrá účinnosť testov sa často dosahuje, ak sa na stanovenie zostupného dávkovania použijú intervaly dávkovania s faktorom dva až štyri, pričom pridanie štvrtej pokusnej skupiny je často vhodnejšie ako používanie veľmi veľkých intervalov (napr. s faktorom vyšším ako 6 – 10) medzi dávkami. Vo všeobecnosti by sa nemali používať faktory vyššie ako 10 a v prípade, že sa použijú, je nutné tento postup odôvodniť.

27. Ako sa ďalej uvádza v usmerňovacom dokumente č. 116 (7), pri výbere dávky je potrebné zvážiť tieto body:

— známe alebo predpokladané nelinearity alebo inflexné body krivky závislosti reakcie od dávky,

— toxikokinetika a rozsahy dávok, pri ktorých dochádza alebo nedochádza k metabolickej indukcii, nasýteniu alebo nelinearite medzi externými a internými dávkami,

— prekurzorné poškodenia, markery účinkov alebo ukazovatele prebiehajúcich kľúčových základných biologických procesov,

▼M4

— kľúčové (alebo predpokladané) aspekty druhu pôsobenia, ako sú dávky, pri ktorých začína vznikať cytotoxicita, narúšajú sa hormonálne hladiny, preťažujú sa homeostatické mechanizmy atď.,

— oblasti krivky závislosti reakcie od dávky, kde je potrebný veľmi podrobný odhad, napr. v oblasti predpokladanej dávky BMD alebo predpokladanej prahovej úrovne,

— zváženie očakávaných úrovní expozície človeka, najmä pri výbere stredných a nízkych dávok.

28. Kontrolnou skupinou je skupina, ktorá nebola vystavená účinkom chemikálie, alebo skupina, ktorej sa podáva nosič, ak sa pri podávaní testovanej chemikálie používa nosič. So zvieratami v kontrolnej skupine sa musí zaobchádzať takisto ako so zvieratami v testovaných skupinách, s výnimkou aplikovania testovanej chemikálie. Ak sa použije nosič, kontrolná skupina dostane nosič v najvyššom objeme, aký bol použitý pri skupinách s dávkami. Ak sa testovaná chemikália podáva v potrave a vedie k výraznému zníženiu príjmu potravy v dôsledku zvýšeného nechutenstva, môže byť užitočné použiť ďalšiu súčasne kŕmenú kontrolnú skupinu, ktorá poslúži ako vhodnejšia kontrola.

Príprava dávok a podávanie testovanej chemikálie

29. Testovaná chemikália sa zvyčajne podáva orálne, v potrave alebo pitnej vode alebo cez sondu. Ďalšie informácie o spôsoboch a metódach podávania sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7). Spôsob a metóda podávania závisí od účelu štúdie, fyzikálnych/chemických vlastností testovanej chemikálie, jej biodostupnosti a prevládajúceho spôsobu a metódy expozície u človeka. Vybratý spôsob a metódu podávania je potrebné odôvodniť. V záujme zabezpečenia dobrých životných podmienok pre zvieratá sa orálna sonda zvyčajne zvolí iba v prípade látok, pri ktorých spôsob a metóda podávania primerane reprezentuje potenciálnu expozíciu u človeka (napr. v prípade liekov). Potravinové alebo environmentálne chemikálie obsahujúce pesticídy sa zvyčajne podávajú v potrave alebo v pitnej vode. V určitých prípadoch, napr. v prípade expozície na pracovisku, však môže byť vhodnejšie podanie iným spôsobom.

30. Ak je to potrebné, testovaná chemikália sa rozpustí alebo suspenduje vo vhodnom nosiči. Náležitá pozornosť by sa mala venovať nasledujúcim vlastnostiam nosiča a ostatným aditívam: vplyv na absorpciu, distribúciu, metabolizmus alebo zadržiavanie testovanej chemikálie, vplyvy na chemické vlastnosti testovanej chemikálie, ktoré môžu zmeniť svoje toxické vlastnosti, vplyv na spotrebu potravy a vody alebo na stav výživy zvierat. Odporúča sa, aby sa vždy, keď je to možné, najskôr zvážilo použitie vodného roztoku/suspenzie, potom roztoku/emulzie v oleji (napr. kukuričný olej) a nakoniec prípadného roztoku v iných nosičoch. Charakteristiky toxicity nosičov iných ako voda musia byť známe. Musia byť k dispozícii informácie o stabilite testovanej chemikálie a homogenite dávkovacích roztokov alebo krmív (podľa potreby) v podmienkach podávania (napr. v potrave).

31. V prípade chemikálií podávaných v potrave alebo pitnej vode je dôležité zabezpečiť, aby množstvá použitej testovanej chemikálie neinterferovali s normálnou výživovou a vodnou bilanciou. V dlhodobých štúdiách toxicity, pri ktorých sa využíva podávanie v potrave, by koncentrácia testovanej chemikálie v krmive zvyčajne nemala presiahnuť horný limit 5 % z celkového množstva krmiva, aby sa zabránilo nutričnej nevyváženosti. Ak je testovaná chemikália podávaná v potrave, môže sa použiť buď konštantná stravná koncentrácia (mg/kg potravy alebo ppm) alebo konštantná úroveň dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť zvieraťa (mg/kg telesnej hmotnosti), ktorá sa vypočíta každý týždeň. Použitú alternatívu je potrebné špecifikovať.

▼M4

32. V prípade orálneho podávania sa zvieratám podávajú dávky testovanej chemikálie denne (sedem dní v týždni) počas 12 mesiacov (fáza chronickej toxicity) alebo 24 mesiacov (fáza karcinogenity), pozri aj odseky 33 a 34. Použitie každého iného režimu dávkovania, napr. päť dní v týždni, sa musí odôvodniť. V prípade podávania cez kožu sa zvieratám zvyčajne aplikuje testovaná chemikália najmenej šesť hodín denne, sedem dní v týždni, ako je uvedené v kapitole B.9 tejto prílohy (11), počas 12 mesiacov (fáza chronickej toxicity) alebo 24 mesiacov (fáza karcinogenity). Inhalačná expozícia sa vykonáva šesť hodín denne, sedem dní v týždni, ale ak je to odôvodnené, môže sa použiť aj expozícia počas piatich dní v týždni. Obdobie expozície zvyčajne trvá 12 mesiacov (fáza chronickej toxicity) alebo 24 mesiacov (fáza karcinogenity). Ak sa v prípade iných hlodavcov ako potkanov použije expozícia oblasti nosa, maximálne trvanie expozície je možné prispôsobiť s cieľom minimalizovať druhovo špecifické utrpenie. Ak sa použije expozícia v trvaní menej ako šesť hodín denne, treba uviesť odôvodnenie. Pozri aj kapitolu B.8 tejto prílohy (9).

33. Ak sa testovaná chemikália zvieratám podáva cez sondu, podáva sa prostredníctvom žalúdočnej sondy alebo vhodnej intubačnej kanyly približne v rovnakom čase každý deň. Zvyčajne sa podáva jedna dávka raz za deň. Ak je napríklad chemikália lokálne dráždivá, je možné zachovať dennú dávku tak, že sa rozdelí a podá v dvoch častiach (dvakrát denne). Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže jednorazovo podať, závisí od veľkosti pokusného zvieraťa. Objem by mal byť podľa možnosti čo najnižší a v prípade hlodavcov by zvyčajne nemal presahovať 1 ml/100 g telesnej hmotnosti (31). Zmeny v aplikovanom objeme sa minimalizujú tým, že sa koncentrácie upravia tak, aby sa zabezpečil stály objem vo všetkých dávkach. Výnimkou sú potenciálne žieravé alebo dráždivé chemikálie, ktoré je nutné zriediť, aby sa predišlo závažným lokálnym účinkom. Nemalo by sa testovať pri koncentráciách, ktoré sú pravdepodobne žieravé alebo dráždivé pre gastrointestinálny trakt.

Trvanie štúdie

34. Obdobie dávkovania a trvanie fázy chronickej toxicity je zvyčajne 12 mesiacov, hoci plán štúdie možno použiť aj pri štúdiách s kratším (napr. šesť alebo deväť mesiacov) alebo dlhším trvaním (napr. 18 alebo 24 mesiacov) v závislosti od požiadaviek konkrétnych regulačných režimov alebo špecifických mechanistických účelov. Odchýlky od 12-mesačného trvania expozície je potrebné odôvodniť, najmä v prípade kratších trvaní. Všetky skupiny s dávkami umiestnené v tejto fáze budú ukončené v plánovanom čase na účely hodnotenia chronickej toxicity a nenádorovej patológie. Satelitné skupiny zahrnuté s cieľom monitorovať reverzibilitu všetkých toxikologických zmien spôsobených skúmanou testovanou chemikáliou by sa mali zachovať bez dávkovania počas najmenej štyroch týždňov a najviac počas jednej tretiny celkového trvania štúdie po ukončení expozície.

35. Fáza karcinogenity tejto štúdie v prípade hlodavcov zvyčajne trvá 24 mesiacov, čo predstavuje väčšiu časť normálnej dĺžky života zvierat, ktoré sa majú použiť. V závislosti od dĺžky života kmeňa živočíšneho druhu v štúdii možno použiť aj kratšie alebo dlhšie trvanie, ale tento postup je nutné odôvodniť. V prípade určitých kmeňov myší, napr. kmeňov AKR/J, C3H/J alebo C57BL/6J, môže byť vhodná štúdia v trvaní 18 mesiacov. Nasledujúce informácie poskytujú usmernenia k trvaniu, ukončeniu štúdie a prežitiu. Ďalšie usmernenia vrátane úvah o prijateľnosti negatívnej štúdie karcinogenity v súvislosti s prežitím počas štúdie sú uvedené v Usmerňovacom dokumente č. 116 o príprave a vykonávaní štúdií chronickej toxicity a karcinogenity (7):

▼M4

— Ukončenie štúdie treba zvážiť, ak počet zvierat, ktoré prežili v skupinách s nižšou dávkou alebo v kontrolnej skupine, klesne pod 25 %.

— Ak v dôsledku toxicity predčasne uhynie iba skupina s vysokou dávkou, štúdia by sa nemala ukončiť.

— Prežitie sa pri jednotlivých pohlaviach posudzuje samostatne.

— Trvanie štúdie by nemalo presiahnuť hranicu, pri ktorej už údaje získané pomocou štúdie nepostačujú na vykonanie štatisticky platného hodnotenia.

POZOROVANIA (FÁZA CHRONICKEJ TOXICITY)

36. Pri všetkých zvieratách si treba všímať morbiditu alebo mortalitu, zvyčajne na začiatku a na konci každého dňa vrátane víkendov a sviatkov. Všeobecné klinické pozorovania sa vykonávajú najmenej raz denne, najlepšie každý deň v rovnakom čase, vzhľadom na časový vrchol očakávaných účinkov po dávkovaní v prípade podávania cez sondu.

37. Všetky zvieratá sa pred prvou expozíciou najmenej raz podrobia dôkladným klinickým pozorovaniam (aby sa umožnilo porovnávanie jednotlivých zvierat navzájom), potom na konci prvého týždňa štúdie a následne každý mesiac. Protokol o pozorovaniach musí byť pripravený tak, aby sa rozdiely medzi jednotlivými pozorovateľmi minimalizovali a neboli závislé od testovacej skupiny. Tieto pozorovania sa vykonávajú mimo domovskej klietky, radšej v štandardnej aréne a v podobnom čase pri každej príležitosti. Musia byť pozorne zaznamenané, pokiaľ možno s použitím hodnotiaceho systému explicitne vymedzeného testovacím laboratóriom. Je potrebné minimalizovať odlišnosti v podmienkach pozorovaní. Medzi príznaky, ktoré je potrebné si všímať, patria zmeny na koži, srsti, očiach, sliznici, výskyt sekrécie, exkrécie a vegetatívnej aktivity (napr. slzenie, piloerekcia, veľkosť zreničiek, nezvyčajné dýchanie), ale uvedené príznaky nie sú vyčerpávajúce. Zmeny v chôdzi, držaní tela a reakcii na zaobchádzanie, ako aj prítomnosť klonických alebo napätých pohybov, stereotypov (napr. opakované točenie sa), prílišné ošetrovanie sa alebo zvláštne správanie (napr. chôdza dozadu, sebaznetvorenie) sa takisto musia zaznamenať (32).

38. Pred prvým podaním testovanej chemikálie sa pri všetkých zvieratách vykoná oftalmologické vyšetrenie pomocou oftalmoskopu alebo iného vhodného zariadenia. Na konci štúdie sa toto vyšetrenie podľa možnosti vykoná pri všetkých zvieratách, ale minimálne pri zvieratách v skupine s vysokou dávkou a zvieratách v kontrolnej skupine. Ak sa po vystavení zvierat účinkom látky zistia zmeny na očiach, musia byť vyšetrené všetky zvieratá. Ak štrukturálna analýza alebo iné informácie indikujú toxicitu očí, potom je potrebné zvýšiť frekvenciu očných vyšetrení.

39. V prípade chemikálií, pri ktorých predchádzajúce 28-dňové a/alebo 90-dňové testy toxicity v opakovaných dávkach indikovali potenciál vyvolať neurotoxické účinky, sa môže nepovinne vykonať určenie zmyslovej reaktivity podnecovanej rôznymi spôsobmi (32) (napr. zvukovými, zrakovými a proprioceptívnymi podnetmi) (33) (34) (35), hodnotenie sily zovretia (36) a hodnotenie motorickej aktivity (37), a to pred začiatkom štúdie a každé tri mesiace po začatí štúdii počas až 12 mesiacov, ako aj pri ukončení štúdie (ak štúdia trvá dlhšie ako 12 mesiacov). Ďalšie podrobnosti o postupoch, ktoré môžu nasledovať, sú uvedené v príslušných odkazoch. Možno však použiť aj iné alternatívne postupy k postupom, ktoré tu boli opísané.

▼M4

40. V prípade chemikálií, pri ktorých predchádzajúce 28-dňové a/alebo 90-dňové testy toxicity v opakovaných dávkach indikovali potenciál vyvolať imunotoxické účinky, možno nepovinne na konci testu vykonať ďalšie vyšetrenia tohto parametra.

Telesná hmotnosť, spotreba potravy/vody a účinnosť krmiva

41. Všetky zvieratá sa odvážia na začiatku testu, najmenej raz týždenne počas prvých 13 týždňov a následne najmenej raz za mesiac. Spotreba potravy a účinnosť krmiva sa merajú najmenej raz za týždeň počas prvých 13 týždňov a následne najmenej raz za mesiac. Ak sa testovaná chemikália podáva vo vode na pitie, spotreba vody sa meria najmenej raz za týždeň počas prvých 13 týždňov a následne najmenej raz za mesiac. Merania spotreby vody by sa mali zvážiť aj v prípade štúdií, pri ktorých sa mení pitný režim.

Hematológia a klinická biochémia

42. V štúdiách využívajúcich hlodavce sa hematologické vyšetrenia vykonajú pri všetkých zvieratách v štúdii (desiatich samcoch a desiatich samiciach v každej skupine), a to po 3, 6 a 12 mesiacoch, a takisto na konci štúdie (ak štúdia trvá dlhšie ako 12 mesiacov). V prípade myší môžu byť na uskutočnenie všetkých požadovaných hematologických vyšetrení potrebné satelitné zvieratá (pozri odsek 19). V prípade štúdií nehlodavcov sa vzorky odoberú menšiemu počtu zvierat (napr. v prípade štúdií psov štyrom zvieratám z každého pohlavia v každej skupine), a to v priebežných časoch na odber vzoriek a na konci štúdie, podobne ako sa uvádza pri štúdiách hlodavcov. Pri hlodavcoch ani nehlodavcoch nie je nutné vykonať merania po troch mesiacoch, ak v predchádzajúcej 90-dňovej štúdii vykonanej pri porovnateľných úrovniach dávok nebol na hematologických parametroch pozorovaný žiadny účinok. Vzorky krvi sa odoberajú v anestézii zo stanoveného miesta, napríklad vpichom do srdca alebo zo zadnej očnicovej dutiny.

43. Je potrebné vyšetriť tieto parametre (38): celkový a diferenciálny počet leukocytov, počet erytrocytov, počet trombocytov, koncentrácia hemoglobínu, hematokrit, stredný objem erytrocytu (MCV), stredná koncentrácia hemoglobínu v erytrocyte (MCH), stredná farebná koncentrácia hemoglobínu (MCHC), protrombínový čas a aktivovaný parciálny tromboplastínový čas. Podľa potreby sa v závislosti od toxicity testovanej chemikálie môžu merať ďalšie hematologické parametre, ako sú Heinzove telieska alebo iná atypická morfológia erytrocytov alebo methemoglobín. Vo všeobecnosti treba zaujať flexibilný postoj v závislosti od pozorovaného a/alebo očakávaného účinku danej testovanej chemikálie. Ak má testovaná chemikália vplyv na hematopoetický systém, môže byť indikovaný aj počet retikulocytov a cytológia kostnej drene, hoci tieto vyšetrenia sa bežne nemusia vykonávať.

44. Klinická biochémia skúma hlavné toxické účinky na tkanivá a najmä účinky na obličky a pečeň. Vyšetrenie sa uskutočňuje zo vzoriek krvi, ktoré sa odoberú všetkým zvieratám v štúdii (desiatim samcom a desiatim samiciam z každej skupiny) v tých istých časových intervaloch, ako je špecifikované pre hematologické vyšetrenia. V prípade myší môžu byť na uskutočnenie všetkých požadovaných vyšetrení klinickej biochémie potrebné satelitné zvieratá. V prípade štúdií nehlodavcov sa vzorky odoberú menšiemu počtu zvierat (napr. v prípade štúdií psov štyrom zvieratám z každého pohlavia v každej skupine), a to v priebežných časoch na odber vzoriek a na konci štúdie, ako sa uvádza pri štúdiách hlodavcov. Pri hlodavcoch ani nehlodavcoch nie je nutné vykonať merania po troch mesiacoch, ak v predchádzajúcej 90-dňovej štúdii vykonanej pri porovnateľných úrovniach dávok nebol na parametroch klinickej biochémie pozorovaný žiadny účinok.

▼M4

Odporúča sa, aby sa zvieratá (s výnimkou myší) noc pred odobratím vzoriek krvi nekŕmili ([1]). Je potrebné vyšetriť tieto parametre (38): glukóza, močovina (močovinový dusík), kreatinín, celkový obsah bielkovín, albumín, vápnik, sodík, draslík, celkový cholesterol, najmenej dva vhodné testy na hepatocelulárne hodnotenie (alanín-aminotransferáza, aspartát-aminotransferáza, glutamát-dehydrogenáza, celkový obsah žlčových kyselín) (39) a najmenej dva vhodné testy na hepatobiliárne hodnotenie (alkalín-fosfatáza, gama-glutamyl-transferáza, 5-nukleotidáza, celkový bilirubín, celkový obsah žlčových kyselín) (39). Podľa potreby sa v závislosti od toxicity testovanej chemikálie môžu merať ďalšie parametre klinickej chémie, ako je hladina triglyceridov nalačno, špecifické hormóny a cholínsteráza. Vo všeobecnosti treba zaujať flexibilný postoj v závislosti od pozorovaného a/alebo očakávaného účinku danej testovanej chemikálie.

45. Rozbor moču sa vykonáva pri všetkých zvieratách v štúdii (desiatich samcoch a desiatich samiciach v každej skupine) zo vzoriek odobratých v rovnakých intervaloch ako v prípade hematológie a klinickej chémie. Nie je nutné vykonať merania po troch mesiacoch, ak v predchádzajúcej 90-dňovej štúdii vykonanej pri porovnateľných úrovniach dávok nebol v rozbore moču pozorovaný žiadny účinok. Do odborného odporúčania pre štúdie klinickej patológie bol zahrnutý tento zoznam parametrov (38): vzhľad, objem, osmolalita alebo špecifická váha, pH, celkový obsah bielkovín a glukóza. Medzi ostatné parametre patria ketón, urobilinogén, bilirubín a okultné krvácanie. Ďalšie parametre sa môžu použiť, ak je potrebné rozšíriť vyšetrovanie pozorovaných účinkov.

46. Vo všeobecnosti je potrebné určiť základné hematologické ukazovatele a ukazovatele klinickej biochémie pred začatím testovania v štúdiách psov, ale nemusia sa určiť v štúdiách hlodavcov (38). Ak však historické základné údaje (pozri odsek 58) nie sú adekvátne, treba uvažovať o získaní týchto údajov.

PATOLÓGIA

Makroskopická pitva

47. Všetky zvieratá v štúdii sa zvyčajne podrobujú kompletnej podrobnej makroskopickej pitve, ktorá zahŕňa dôkladné skúmanie vonkajšieho povrchu tela, všetkých telesných otvorov a lebečnej, hrudnej a brušnej dutiny a ich obsahu. Môžu sa však takisto zabezpečiť (v prípade priebežného utrácania alebo satelitných skupín), aby sa merania obmedzovali na špecifické kľúčové ukazovatele, ako je neurotoxicita alebo imunotoxicita (pozri odsek 21). Tieto zvieratá sa nemusia podrobiť pitve ani ďalším postupom opísaným v nasledujúcich odsekoch. Pri sentinelových zvieratách môže byť v závislosti od konkrétneho prípadu potrebná pitva, o ktorej rozhodne vedúci štúdie.

([1]) Pri mnohých meraniach v sére a plazme, najmä glukózy, sa uprednostňuje nepodávanie potravy cez noc pred odberom. Hlavným dôvodom je zvýšenie pravdepodobnosti kolísania hodnôt ako nevyhnutný dôsledok prijímania potravy. Môže to viesť k zakrytiu jemnejších účinkov a sťaží to interpretáciu. Treba však poznamenať, že nočný pôst môže rušivo vplývať na celkový metabolizmus zvierat a čiastočne aj na štúdie výživy, a môže to rušiť aj dennú expozíciu testovanej chemikálii. Všetky zvieratá by sa mali posudzovať v rovnakých fyziologických podmienkach, a preto by sa podrobné alebo neurologické hodnotenia podľa možnosti mali naplánovať na iný deň ako odber vzoriek na klinickú biochémiu.

▼**M4**

48. Orgánové hmotnosti by sa mali zistiť pri všetkých zvieratách, s výnimkou tých, ktoré sú vylúčené podľa ďalšej časti odseku 47. Nadobličky, mozog, nadsemenníky, srdce, obličky, pečeň, vaječníky, slezina, semenníky, štítna žľaza (vážená po fixácii, s prištítnymi telieskami) a maternica zo všetkých zvierat (okrem tých, pri ktorých sa zistilo chradnutie alebo ktoré sa priebežne utratili) by sa mali upraviť na priľnavej tkanine a je potrebné čo najrýchlejšie po disekcii zistiť ich mokrú hmotnosť, aby sa predišlo vyschnutiu.

49. Tieto tkanivá by sa mali uchovávať v čo najvhodnejšom fixačnom médiu na obidva typy tkanív a na neskoršie histopatologické vyšetrenie (40) (vyšetrenia tkanív v hranatých zátvorkách sú nepovinné):

Všetky makroskopické poškodenia	srdce	pankreas	žalúdok (predný žalúdok, žľaznatý žalúdok)
nadoblička	ileum	prištítne teliesko	[zuby]
aorta	lačník	periférny nerv	semenníky
mozog (vrátane častí predného mozgu, mozočka a predĺženej miechy/mosta)	oblička	hypofýza	týmus
slepé črevo	slzná žľaza (extraorbitálna)	prostata	štítna žľaza
krčok maternice	pečeň	rektum	[jazyk]
koagulačná žľaza	pľúca	slinná žľaza	priedušnica
hrubé črevo	lymfatické uzliny (povrchové aj hlboké)	semenný mechúrik	močový mechúr
dvanástnik	prsná žľaza (povinné pri samiciach, a ak je zrejmé, že možno urobiť disekciu, aj pri samcoch)	kostrové svaly	maternica (vrátane krčka maternice)
nadsemenníky	[horný dýchací trakt vrátane nosa, nosových mušlí a prínosových dutín]	koža	[močovod]
oko (vrátane sietnice)	pažerák	miecha (na troch úrovniach: krčnej, hrudnej a lumbálnej)	[močová rúra]
[stehnová kosť s kĺbom]	[čuchový bulbus]	slezina	vagína
žlčník (v prípade iných druhov zvierat ako potkany)	vaječníky	[hrudná kosť]	prierez kostnej drene a/alebo čerstvý aspirát kostnej drene
Harderova žľaza			

▼M4

V prípade párových orgánov, ako sú napríklad obličky a nadobličky, sa zachovajú obidva orgány. Z klinických a iných nálezov môže vyplynúť potreba vyšetrenia ďalších tkanív. Takisto by sa mali zachovať všetky orgány, ktoré vzhľadom na známe vlastnosti testovanej chemikálie možno považovať za cieľové orgány. V štúdiách, v ktorých sa chemikália podáva dermálne, sa vyšetria tie isté orgány ako v prípade orálneho podávania, pričom je nevyhnutný špecifický odber vzorky a zachovanie kože z miesta aplikácie chemikálie. V inhalačných štúdiách sa zoznam zachovaných a skúmaných tkanív dýchacieho traktu zostaví na základe odporúčaní kapitoly B.8 tejto prílohy (9) a kapitoly B.29 tejto prílohy (10). Pokiaľ ide o orgány/tkanivá (a popri špecificky uchovávaných tkanivách dýchacieho traktu), je potrebné vyšetriť tie isté orgány ako v prípade orálnej expozície.

Histopatológia

50. K dispozícii sú usmernenia o dobrej praxi na vykonávanie štúdií toxikologickej patológie (40). Histopatologickým vyšetreniam sa podrobia minimálne:

— všetky tkanivá zo skupín s vysokou dávkou a kontrolných skupín,

— všetky tkanivá zo zvierat, ktoré uhynuli alebo boli utratené v priebehu štúdie,

— všetky tkanivá vykazujúce makroskopické abnormality,

— cieľové tkanivá alebo tkanivá, ktoré v skupinách s vysokou dávkou vykazujú zmeny spôsobené aplikáciou chemikálie, zo všetkých zvierat zo všetkých skupín s odlišným dávkovaním,

— v prípade párových orgánov, ako sú napríklad obličky alebo nadobličky, sa vyšetria obidva orgány.

POZOROVANIA (FÁZA KARCINOGENITY)

51. Pri všetkých zvieratách si treba všímať morbiditu alebo mortalitu, zvyčajne na začiatku a na konci každého dňa vrátane víkendov a sviatkov. Pri zvieratách sa navyše raz denne kontrolujú špecifické príznaky, ktoré majú toxikologický význam. V prípade štúdií, v ktorých sa chemikália podáva cez sondu, sa zvieratá kontrolujú okamžite po podaní dávky. Osobitnú pozornosť treba venovať tvorbe nádorov. Čas nástupu nádoru, lokalizáciu, rozmery, vzhľad a progresiu každého výrazne viditeľného alebo hmatateľného nádoru je nutné zaznamenať.

52. Všetky zvieratá sa odvážia na začiatku testu, najmenej raz týždenne počas prvých 13 týždňov a následne najmenej raz za mesiac. Spotreba potravy a účinnosť krmiva sa merajú najmenej raz za týždeň počas prvých 13 týždňov a následne najmenej raz za mesiac. Ak sa testovaná chemikália podáva vo vode na pitie, spotreba vody sa meria najmenej raz za týždeň počas prvých 13 týždňov a následne najmenej raz za mesiac. Merania spotreby vody by sa mali zvážiť aj v prípade štúdií, pri ktorých sa mení pitný režim.

▼M4

Hematológia, klinická biochémia a iné merania

53. S cieľom maximalizovať informácie získané pomocou štúdie, najmä pokiaľ ide o úvahy týkajúce sa druhu pôsobenia, možno odobrať vzorky krvi na hematológiu a klinickú biochémiu, pričom rozhodnutie o tomto kroku ostáva na vedúcom štúdie. Takisto môže byť vhodné urobiť rozbor moču. Údaje o zvieratách použitých vo fáze chronickej toxicity štúdie, zvyčajne v trvaní 12 mesiacov (odsek 34), o týchto parametroch poskytnú informácie. Ďalšie usmernenia o význame odberu takýchto vzoriek v rámci štúdie karcinogenity sú uvedené v usmerňovacom dokumente č. 116 (7). Ak sa odoberú vzorky krvi, mali by sa odoberať na konci testovacieho obdobia hneď pred utratením alebo počas utrácania zvierat. Odoberajú sa v anestézii zo stanoveného miesta, napríklad vpichom do srdca alebo zo zadnej očnicovej dutiny. Takisto je možné na vyšetrenie pripraviť krvné stery, najmä ak sa zdá, že kostná dreň je cieľovým orgánom, hoci význam takéhoto vyšetrenia krvných sterov vo fáze karcinogenity pri hodnotení karcinogénneho/onkogénneho potenciálu sa spochybnil (38).

PATOLÓGIA

Makroskopická pitva

54. Všetky zvieratá v štúdii s výnimkou sentinelových zvierat a ostatných satelitných zvierat (pozri odsek 20) sa podrobujú kompletnej podrobnej makroskopickej pitve, ktorá zahŕňa dôkladné skúmanie vonkajšieho povrchu tela, všetkých telesných otvorov a lebečnej, hrudnej a brušnej dutiny a ich obsahu. Pri sentinelových a ostatných satelitných zvieratách môže byť v závislosti od konkrétneho prípadu potrebná pitva, o ktorej rozhodne vedúci štúdie. Orgánové hmotnosti zvyčajne nie sú súčasťou štúdie karcinogenity, keďže geriatrické zmeny a v neskorších štádiách tvorba nádorov znehodnocujú užitočnosť údajov o orgánových hmotnostiach. Môžu však mať veľký význam pri hodnotení váhy dôkazov, najmä v rámci úvah o druhu pôsobenia. Ak sú súčasťou satelitnej štúdie, zozbierajú sa najneskôr do jedného roka od začatia štúdie.

55. Tieto tkanivá by sa mali uchovávať v čo najvhodnejšom fixačnom médiu na obidva typy tkanív a na neskoršie histopatologické vyšetrenie (40) (vyšetrenia tkanív v hranatých zátvorkách sú nepovinné):

Všetky makroskopické poškodenia	srdce	pankreas	žalúdok (predný žalúdok, žľaznatý žalúdok)
nadoblička	ileum	prištítne teliesko	[zuby]
aorta	lačník	periférny nerv	semenníky
mozog (vrátane častí predného mozgu, mozočka a predĺženej miechy/mosta)	oblička	hypofýza	týmus
slepé črevo	slzná žľaza (extraorbitálna)	prostata	štítna žľaza
krčok maternice	pečeň	rektum	[jazyk]
koagulačná žľaza	pľúca	slinná žľaza	priedušnica
hrubé črevo	lymfatické uzliny (povrchové aj hlboké)	semenný mechúrik	močový mechúr

▼M4

dvanástnik	prsná žľaza (povinné pri samiciach, a ak je zrejmé, že možno urobiť disekciu, aj pri samcoch)	kostrové svaly	maternica (vrátane krčka maternice)
nadsemenníky	[horný dýchací trakt vrátane nosa, nosových mušlí a prínosových dutín]	koža	[močovod]
oko (vrátane sietnice)	pažerák	miecha (na troch úrovniach: krčnej, hrudnej a lumbálnej)	[močová rúra]
[stehnová kosť s kĺbom]	[čuchový bulbus]	slezina	vagína
žlčník (v prípade iných druhov zvierat ako potkany)	vaječníky	[hrudná kosť]	prierez kostnej drene a/alebo čerstvý aspirát kostnej drene
Harderova žľaza			

V prípade párových orgánov, ako sú napríklad obličky a nadobličky, sa zachovajú obidva orgány. Z klinických a iných nálezov môže vyplynúť potreba vyšetrenia ďalších tkanív. Takisto by sa mali zachovať všetky orgány, ktoré vzhľadom na známe vlastnosti testovanej chemikálie možno považovať za cieľové orgány. V štúdiách, v ktorých sa chemikália podáva dermálne, sa vyšetria tie isté orgány ako v prípade orálneho podávania, pričom je nevyhnutný špecifický odber vzorky a zachovanie kože z miesta aplikácie chemikálie. V inhalačných štúdiách sa zoznam zachovaných a skúmaných tkanív dýchacieho traktu zostaví na základe odporúčaní kapitoly B.8 tejto prílohy (8) a kapitoly B.29 tejto prílohy (9). Pokiaľ ide o orgány/tkanivá (a popri špecificky uchovávaných tkanivách dýchacieho traktu), je potrebné vyšetriť tie isté orgány ako v prípade orálnej expozície.

Histopatológia

56. K dispozícii sú usmernenia o dobrej praxi na vykonávanie štúdií toxikologickej patológie (40). Vyšetreniam sa podrobia minimálne tieto tkanivá:

— všetky tkanivá zo skupín s vysokou dávkou a kontrolných skupín,

— všetky tkanivá zo zvierat, ktoré uhynuli alebo boli utratené v priebehu štúdie,

— všetky tkanivá vykazujúce makroskopické abnormality vrátane nádorov,

— ak sú v skupine s vysokou dávkou pozorované histopatologické zmeny súvisiace s aplikáciou chemikálie, tie isté tkanivá sa vyšetria pri všetkých zvieratách zo všetkých skupín s odlišným dávkovaním,

— v prípade párových orgánov, ako sú napríklad obličky alebo nadobličky, sa vyšetria obidva orgány.

▼M4

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV (KARCINOGENITA A CHRONICKÁ TOXICITA)

Údaje

57. Pri všetkých hodnotených parametroch sa uvedú údaje o jednotlivých zvieratách. Navyše všetky údaje sa musia zhrnúť v tabuľkovej forme, pričom ukazujú pre každú testovanú skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat uhynutých počas testu alebo usmrtených z humánnych dôvodov, čas uhynutia alebo humánneho usmrtenia jednotlivých zvierat, počet zvierat, pri ktorých sa prejavili známky toxicity, opis pozorovaných známok toxicity vrátane nábehu, času a prudkosti toxických účinkov, počet zvierat vykazujúcich poškodenie, typy poškodení a percentuálne množstvo zvierat, pri ktorých sa prejavil daný typ poškodenia. Zhrnuté údaje v tabuľkách musia okrem stupňa poškodení udávať priemer a smerodajnú odchýlku (v prípade priebežných údajov o teste) pri zvieratách vykazujúcich toxické účinky alebo poškodenia.

58. Pri interpretácii výsledkov štúdie môžu byť užitočné historické kontrolné údaje, napr. v prípade, ak existujú indikácie, že údaje získané v rámci súbežných kontrol sa výrazne odlišujú v porovnaní s novými údajmi pri kontrolných zvieratách z rovnakého testovacieho zariadenia/kolónie. V prípade hodnotenia historických kontrolných údajov by ich malo predložiť to isté laboratórium a mali by sa vzťahovať na zvieratá rovnakého veku a z toho istého kmeňa vytvoreného v priebehu piatich rokov, ktoré danej štúdii predchádzali.

59. Ak je to možné, numerické výsledky budú spracované vhodne a všeobecne uplatniteľnou štatistickou metódou. Štatistické metódy a údaje, ktoré budú analyzované, sa vyberú počas plánovania štúdie (odsek 9). Výber musí v prípade potreby počítať s úpravami vzhľadom na prežitie.

60. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— fyzikálny charakter, čistota a fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikačné údaje,

— zdroj chemikálie,

— číslo šarže,

— certifikát chemickej analýzy.

Nosič (v prípade potreby):

— odôvodnenie výberu nosiča (ak je iný ako voda).

Testovacie zvieratá:

— použitý druh/kmeň a odôvodnenie výberu,

— počet, vek a pohlavie zvierat na začiatku testu,

— zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo atď.,

— hmotnosti jednotlivých zvierat na začiatku testu.

▼M4

Podmienky testovania:

— odôvodnenie spôsobu podávania a výberu dávky,

— ak je to použiteľné, štatistické metódy použité na analýzu údajov,

— údaje o príprave testovanej chemikálie/krmiva,

— analytické údaje o dosiahnutej koncentrácii, stabilite a homogenite prípravku,

— spôsob podávania a údaje o podávaní testovanej chemikálie,

— v prípade inhalačných štúdií, či ide o expozíciu oblasti nosa alebo expozíciu celého tela,

— skutočné dávky (mg/kg telesnej hmotnosti/deň), faktor konverzie z potravy/pitnej vody, koncentrácia testovanej chemikálie (mg/kg alebo ppm), ak je to použiteľné,

— údaje o kvalite potravy a vody.

Výsledky (predloží sa tabuľkové zhrnutie údajov a údaje o jednotlivých zvieratách)

Všeobecné informácie:

— údaje o prežití,

— telesná hmotnosť a zmeny telesnej hmotnosti,

— spotreba potravy, výpočty účinnosti krmiva, pokiaľ sa vykonali, a spotreba vody, ak je to použiteľné,

— toxikokinetické údaje, ak sú dostupné,

— oftalmoskopia (ak je dostupná),

— hematológia (ak je dostupná),

— klinická chémia (ak je dostupná).

Klinické nálezy:

— príznaky toxicity,

— rozsah (a ak sa hodnotí, závažnosť) každej abnormality,

— povaha, závažnosť a trvanie klinických pozorovaní (či už prechodných alebo stálych).

Údaje o pitve:

— konečná telesná hmotnosť,

— orgánové hmotnosti a ich pomery, ak je to použiteľné,

— pitevné nálezy, rozsah a závažnosť abnormalít.

Histopatológia:

— nenádorové histopatologické nálezy,

— nádorové histopatologické nálezy,

▼M4

— korelácia medzi makroskopickými a mikroskopickými nálezmi,

— podrobný opis všetkých histopatologických nálezov súvisiacich s aplikáciou chemikálie vrátane stupňa závažnosti,

— správa o všetkých partnerských hodnoteniach preparátov (sklíčok).

Štatistické spracovanie výsledkov v prípade potreby

Rozbor výsledkov zahŕňajúci:

— rozbor všetkých prístupov modelovania,

— vzťah medzi dávkou a reakciou,

— historické kontrolné údaje,

— zváženie všetkých informácií o druhu pôsobenia,

— stanovenie BMD, NOAEL alebo LOAEL,

— význam pre človeka.

Závery

LITERATÚRA

1. OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rím, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paríž.

2. EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.

3. Combes, R. D., Gaunt, I., Balls, M. (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163 – 208

4. Barlow, S. M., Greig, J. B., Bridges, J. W., a kol. (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145 – 191

5. Chhabra, R. S., Bucher, J. R., Wolfe, M., Portier, C. (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437 – 445.

6. Kapitola B.27 tejto prílohy, Test subchronickej orálnej toxicity: opakovaná 90-dňová štúdia orálnej toxicity u nehlodavcov.

7. OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – druhé vydanie. Series on Testing and Assessment No. 116, dostupné na verejnej webovej stránke OECD s usmerneniami na vykonávanie testov na adrese www.oecd.org/env/testguidelines.

8. OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paríž.

9. Kapitola B.8 tejto prílohy. Subakútna inhalačná toxicita: 28-dňová štúdia.

10. Kapitola B.29 tejto prílohy, Subchronická inhalačná toxicita: 90-dňová štúdia.

11. Kapitola B.9 tejto prílohy, Toxicita po 28–dňovej opakovanej dávke (dermálna).

▼**M4**

12. Boobis, A. R., Cohen, S. M., Dellarco, V., McGregor, D., Meek, M. E., Vickers, C., Willcocks, D., Farland, W. (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. Crit. Rev. in Toxicol, 36: 793 – 801.

13. Cohen, S. M., Meek, M. E., Klaunig, J. E., Patton, D. E., Fenner-Crisp, PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. Crit. Rev. Toxicol. 33: 581 – 589.

14. Holsapple, M. P., Pitot, H. C., Cohen, S. N., Boobis, A. R., Klaunig, J. E., Pastoor, T., Dellarco, V. L., Dragan, Y. P. (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. Toxicol. Sci. 89: 51 – 56.

15. Meek, E. M., Bucher, J. R., Cohen, S. M., Dellarco, V., Hill, R. N., Lehman-McKemmon, L. D., Longfellow, D. G., Pastoor, T., Seed, J., Patton D. E. (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. Crit. Rev. Toxicol. 33: 591 – 653.

16. Carmichael, N. G., Barton, H. A., Boobis, A. R. a kol. (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Crit. Rev. Toxicol. 36, 1 – 7.

17. Barton, H. A., Pastoor, T. P., Baetcke, T. a kol. (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Crit. Rev. Toxicol. 36: 9 – 35.

18. Doe, J. E., Boobis, A. R., Blacker, A. a kol. (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 37 – 68.

19. Cooper, R. L., Lamb, J. S., Barlow, S. M. a kol. (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Crit. Rev. Toxicol. 36: 69 – 98.

20. OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paríž.

21. OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paríž.

22. Rhomberg, L. R., Baetcke, K., Blancato, J., Bus, J., Cohen, S., Conolly, R., Dixit, R., Doe, J., Ekelman, K., Fenner-Crisp P., Harvey, P., Hattis, D., Jacobs, A., Jacobson-Kram, D., Lewandowski, T., Liteplo, R., Pelkonen, O., Rice, J., Somers, D., Turturro, A., West, W., Olin, S. (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection Crit Rev. Toxicol. 37 (9): 729 – 837.

23. ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.

24. Griffiths, S. A., Parkinson, C., McAuslane, J. A. N., a Lumley, C. E. (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. The Toxicologist 14(1): 214.

25. Usui, T., Griffiths, S. A., a Lumley, C. E. (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy, P. O. F., & Harron, D. W. G. (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. s. 279 – 284.

26. Carmichael, N. G., Enzmann, H., Pate, I., Waechter, F. (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. Environ Health Perspect 105: 1196 – 1203.

▼M4

27. Smernica Európskeho parlamentu a Rady 2010/63/EÚ z 22. septembra 2012 o ochrane zvierat používaných na vedecké účely (Ú. v. EÚ L 276, 20.10.2010, s. 33).

28. National Research Council, 1985. Guide for the care and use of laboratory animals. NIH Publication No. 86-23. Washington D.C., US. Dept. of Health and Human Services.

29. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, december 1989). Publication on the Planning and Structure of Animal Facilities for Institutes Performing Animal Experiments. ISBN 3-906255-06-9.

30. GV-SOLAS (Society for Laboratory Animal Science, Gesellschaft für Versuchstierkunde, 2006). Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems.

31. Diehl, K.-H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J.-M., van de Vorstenbosch, C. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology, 21: 15 – 23.

32. IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60.

33. Tupper, D. E., Wallace, R. B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999 – 1003.

34. Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health 9: 691 – 704.

35. Moser, V. C., McDaniel, K. M., Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267 – 283.

36. Meyer, O. A., Tilson, H. A., Byrd, W. C., Riley, M. T. (1979). A Method for the RoutineAssessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233 – 236.

37. Crofton, K. M., Howard, J. L., Moser, V. C., Gill, M. W., Reiter, L. W., Tilson, H. A., MacPhail, R. C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol. 13: 599 – 609.

38. Weingand, K., Brown, G., Hall, R. a kol. (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. Fundam. & Appl. Toxicol. 29: 198 – 201.

39. EMEA (návrh) dokument „Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity“ (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).

40. Crissman, J. W., Goodman, D. G., Hildebrandt, P. K. a kol. (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. Toxicologic Pathology 32: 126 – 131.

▼**M4**

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMU

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

▼B

B.34. JEDNOGENERAČNÝ REPRODUKČNÝ TEST TOXICITY

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIE

Pozri všeobecný úvod časť B.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Testovaná látka je podávaná v odstupňovaných dávkach v niekoľkých skupinách samcov a samíc. Samce by mali byť ovplyvňované počas rastu a najmenej jeden úplný cyklus spermatogenézy (približne 56 dní u myší a 70 dní u potkanov) s cieľom vyvolať testovanou látkou nepriaznivé účinky na spermatogenézu.

Samice parentálnej (P) generácie by mali byť vystavené po dobu aspoň dvoch kompletných ovulačných cyklov s cieľom vyvolať testovanou látkou nepriaznivé účinky na ovuláciu. Potom sa zvieratá spária. Testovaná látka sa podáva obom pohlaviam počas periódy párenia a potom len samiciam počas gravidity a počas laktácie. Pre inhalačné vystavenie je potrebné túto metódu modifikovať.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Žiadne.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. *Príprava*

Pred testom sú zdravé mladé dospelé zvieratá náhodne rozdelené do skupín vystavenia a kontrolných skupín a označené. Zvieratá sú držané v experimentálnych laboratórnych podmienkach aspoň 5 dní pred testom. Odporúča sa podávať testovanú látku v potrave alebo v pitnej vode. Ostatné spôsoby podávania sú tiež prijateľné. Všetky zvieratá by mali byť vystavené rovnakým spôsobom počas primeranej doby experimentu. Ak sú nosiče alebo ďalšie pomocné látky použité pri dávkovaní, nemali by mať toxický efekt. Dávkovanie by malo byť sedem dní v týždni.

▼B

1.6.2. Pokusné zvieratá

Výber druhov Preferované druhy sú myš a potkan. Mali by byť použité zdravé zvieratá, ktoré neboli predmetom žiadnych testov. Nemali by byť použité kmene s nízkou plodnosťou. Zvieratá by mali byť charakterizované vo vzťahu k druhu, kmeňu, pohlaviu, hmotnosti a/alebo veku.

Samce aj samice by mali byť primerane vyšetrené na stanovenie plodnosti. Všetky testované aj kontrolné zvieratá by mali pred začiatkom podávania testovanej látky odstavené od matky.

Počet a pohlavie

Každá vystavená aj kontrolná skupina by mala obsahovať dostatočný počet zvierat, čo znamená asi 20 gravidných samíc v čase vrhu alebo krátko pred ním.

Cieľom je získať dosť gravidít a potomstva pre zabezpečenie zmysluplného vyhodnotenia potenciálneho účinku testovanej látky na plodnosť, graviditu a správanie matky v P generácii a na kojené mláďatá, rast a vývin F_1 potomstva po odstavení od matky.

1.6.3. Podmienky testu

Potrava a voda by sa mali poskytovať ľubovoľne (ad libidum). Tesne pred vrhom by mali byť samice separované v pôrodných klietkach alebo v klietkach pre matky s poskytnutým materiálom pre hniezdenie.

1.6.3.1. Testované dávky

Mali by byť použité aspoň tri testované dávky a kontrola. Ak je nosič použitý pre podávanie testovanej látky, kontrolná skupina by mala dostávať nosič v najväčšom použitom objeme. Ak testovaná látka spôsobuje redukciu príjmu potravy alebo jej metabolizmu, je potrebné pouvažovať o použití zodpovedajúcej kontrolnej skupiny. V ideálnom prípade, ak neexistuje nejaké obmedzenie kvôli fyzikálnej/chemickej povahe alebo biologickým vlastnostiam testovanej látky, najvyššia dávka by mala indukovať toxické príznaky, ale nie mortalitu v parentálnej (P) generácii. Stredná dávka alebo dávky by mali indukovať minimálne toxické príznaky spôsobené testovanou látkou a najnižšia dávka by nemala indukovať žiadne pozorovateľné nepriaznivé účinky na rodičov alebo potomkov. Ak sa určená dávka podáva sondou alebo v kapsuliach, dávka by mala byť závislá na individuálnej hmotnosti zvierat a prispôsobovaná každý týždeň zmenám hmotnosti. Pre samice počas gravidity môže dávka závisieť od hmotnosti v nultom alebo šiestom dni gravidity, ak je potrebné.

1.6.3.2. Limitný test

V prípade látky s nízkou toxicitou, ak dávka aspoň 1 000 mg/kg neindukuje žiadne negatívne vplyvy na reprodukčnú schopnosť, sledovanie ďalších dávok nie je nevyhnutné. Ak predbežné pokusy s najvyššou dávkou a jasnými toxickými príznakmi na matku nevykazujú nepriaznivý účinok na plodnosť, sledovanie ďalších dávok nie je nevyhnutné.

▼B

1.6.3.3. *Vykonanie testu*

Experimentálny plán

Začiatok denného dávkovania samcom parentálnej (P) generácie by mal byť v piatom až deviatom týždni života, keď by mali byť odstavení od matky a aklimatizovaní aspoň päť dní. U potkanov dávkovanie pokračuje 10 týždňov do periódy párenia (pre myši osem týždňov). Samce môžu byť utratené a vyšetrené na konci periódy párenia alebo môžu byť držané na testovanej diéte pre možnosť druhého vrhu a môžu byť utratené a vyšetrené niekedy na konci pozorovania. Pre parentálne (P) samice sa dávkovanie začína aspoň po piatich dňoch aklimatizácie a pokračuje aspoň dva týždne pred párením. Denné dávkovanie P samíc by malo pokračovať počas trojtýždňovej periódy párenia, gravidity až do odstavenia F_1 potomstva. Do úvahy by sa mala brať modifikácia dávkovacieho plánu na základe iných dostupných informácií o testovanej látke, ako je indukcia metabolizmu alebo bioakumulácia.

Postup pri párení

V reprodukčnom teste toxicity sa môžu použiť pomery párenia 1:1 (jeden samec a jedna samica) alebo 1:2 (jeden samec a dve samice).

Pri pomere párenia 1:1 samica môže byť umiestnená s tým istým samcom, kým sa neprejaví gravidita alebo uplynú tri týždne. Každé ráno by mali byť samice vyšetrené na prítomnosť spermií alebo vaginálnej zátky. Deň 0 gravidity je definovaný ako deň, keď je spozorovaná vaginálna zátka alebo spermie.

Pri bezvýslednom párení by mali byť zvieratá vyšetrené na príčinu neplodnosti.

To znamená možnosť ďalšieho párenia s inými samcami alebo samicami, prípadne mikroskopické vyšetrenie reprodukčných orgánov a overenie ovulačného cyklu alebo spermatogenézy.

Veľkosť vrhu

Ovplyvňovanie zvierat počas testu poskytuje normálnu možnosť vrhu a výchovu potomstva do štádia odstavenia od matky bez štandardizácie vrhov.

Ak je urobená štandardizácia, predpokladajú sa nasledovné postupy. Medzi dňom 1 a 4 po narodení je veľkosť každého vrhu upravená elimináciou plodov navyše, a to selekciou štyroch samcov a štyroch samíc v jednom vrhu.

Ak počet samcov a samíc neumožňuje získať štyri zvieratá z každého pohlavia v jednom vrhu, je akceptovateľná čiastočná úprava (napríklad päť samcov a tri samice). Úprava je nereálna pre vrhy s menej ako ôsmimi plodmi.

▼B

1.6.4. Pozorovania

Počas testovacieho obdobia by malo byť každé zviera pozorované denne aspoň raz. Mali by byť zaznamenané nápadné zmeny správania, príznaky ťažkého alebo oneskoreného vrhu a všetky toxické príznaky, vrátane úmrtnosti. V období pred párením a počas párenia by mala byť denne meraná spotreba potravy. Po vrhu a počas laktácie by mala byť meraná spotreba potravy (a spotreba vody ak je testovaná látka podávaná v pitnej vode) v ten istý deň ako váženie vrhu. P samce a samice by mali byť odvážené prvý deň dávkovania a potom raz týždenne. Tieto pozorovania by mali byť zaznamenávané individuálne pre každé dospelé zviera.

Trvanie gravidity sa počíta odo dňa 0 gravidity. Každý vrh by sa mal čo najskôr po pôrode vyšetriť a stanoviť množstvo a pohlavie plodov, potratov (mŕtvych plodov) živých plodov a prítomnosť výrazných anomálií.

Mŕtve plody a plody utratené v deň 4 by sa mali fixovať a vyšetriť na možné defekty. Živé plody by sa mali spočítať a vrhy odvážiť ráno hneď po narodení, na 4. a 7. deň a potom raz za týždeň do konca pozorovania, keď by mali byť zvieratá odvážené individuálne.

Mali by sa zaznamenať fyzické abnormality a poruchy správania samíc alebo potomstva.

1.6.5. Patológia

1.6.5.1. Pitva

Zvieratá P generácie by sa mali makroskopicky vyšetriť v čase utratenia alebo uhynutia počas testu na všetky štruktúrne abnormality alebo patologické zmeny so špeciálnou pozornosťou na reprodukčné orgány. Mŕtve a chradnúce plody by sa mali vyšetriť na defekty.

1.6.5.2. Histopatológia

Pre mikroskopické vyšetrenie by sa mali fixovať vaječníky, maternica, krček maternice, vagína, semenníky, nadsemenníky, semenné váčky, prostata, koagulačná žľaza, hypofýza, a zasiahnuté orgány všetkých P zvierat. V prípade že tieto orgány neboli vyšetrené v iných testoch s viacerými dávkami, mali by byť mikroskopicky vyšetrené zo všetkých zvierat zo skupiny s najvyššou dávkou a z kontrolnej skupiny a zo zvierat, ktoré uhynuli počas pozorovania.

Orgány vykazujúce abnormality v týchto zvieratách by mali byť potom vyšetrené vo všetkých ostatných P zvieratách. Za týchto okolností by malo byť urobené mikroskopické vyšetrenie všetkých tkanív vykazujúcich výrazné patologické zmeny. Ak sa počas párenia zistila neplodnosť, mali by byť podrobené mikroskopickému vyšetreniu reprodukčné orgány zvierat.

▼B

2. **ÚDAJE**

Údaje by mali byť zhrnuté v tabuľke a udávať pre každú testovaciu skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet plodných samcov, počet gravidných samíc, typy zmien a percento zvierat so všetkými typmi zmien.

Ak je to možné, výsledky by mali byť vyhodnotené vhodnou štatistickou metódou. Môže byť použitá hociktorá uznaná štatistická metóda.

3. **SPRÁVA**

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu má podľa možnosti obsahovať nasledujúce informácie:

— použitý druh/kmeň,

— údaje o toxickej reakcii pri jednotlivých pohlaviach, dávkach, vrátane plodnosti, gravidity a životaschopnosti,

— časy úmrtí počas pozorovania alebo údaje, či zvieratá prežili do plánovaného času na utratenie, alebo do ukončenia testu,

— tabuľku uvádzajúcu údaje o hmotnosti každého vrhu, priemernú hmotnosť plodov a individuálnu hmotnosť plodov na konci testu,

— toxické alebo iné príznaky na reprodukciu, potomstvo a postnatálny rast,

— čas objavenia každého abnormálneho príznaku a jeho ďalší vývoj,

— údaje o hmotnosti pre P zvieratá,

— nálezy pitvy,

— detailný opis všetkých mikroskopických nálezov,

— štatistické spracovanie výsledkov, kde je to vhodné,

— diskusia o výsledkoch,

— interpretácia výsledkov.

3.2. VYHODNOTENIE A INTERPRETÁCIA

Pozri všeobecný úvod časť B.

4. **ODKAZY**

Pozri všeobecný úvod časť B.

▼B

B.35. **DVOJGENERAČNÁ ŠTÚDIA REPRODUKČNEJ TOXICITY**

1. **METÓDA**

Táto metóda zodpovedá OECD TG 416 (2001).

1.1. ÚVOD

Táto metóda pre dvojgeneračné reprodukčné testovanie je navrhnutá tak, aby poskytla všeobecné informácie, ktoré sa týkajú účinkov testovanej látky na integritu a činnosť samčích a samičích reprodukčných systémov, vrátane funkcie pohlavných žliaz, estrálneho cyklu, rozmnožovacieho správania, počatia, gravidity, pôrodu, laktácie a odstavenia a rastu a vývoja potomstva. Štúdia môže poskytnúť informácie aj o účinkoch testovanej látky na neonatálnu morbiditu, mortalitu a predbežné údaje o prenatálnej a postnatálnej vývojovej toxicite a slúži ako usmernenie pre ďalšie testy. Okrem pozorovania rastu a vývoja F_1 generácie je táto testovacia metóda určená aj na posúdenie integrity a činnosti samčích a samičích reprodukčných systémov, ako aj rastu a vývoja F_2 generácie. Za účelom získania ďalších informácií o vývojovej toxicite a funkčných poruchách je možné do tohto protokolu zapracovať tiež ďalšie časti štúdie s použitím metód pre vývojovú toxicitu a/alebo v prípade potreby vývojovú neurotoxicitu, alebo by sa tieto konečné body mohli skúmať v samostatných štúdiách s použitím vhodných testovacích metód.

1.2. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Testovaná látka sa podáva viacerým skupinám samčích a samičích pokusných zvierat v odstupňovaných dávkach. Samcom P generácie sa podáva testovaná látka počas rastu a minimálne počas jedného úplného cyklu spermatogenézy (približne 56 dní u myši a 70 dní u potkana), aby sa zistili nepriaznivé účinky na spermatogenézu. Účinky na spermie sa stanovujú na základe množstva parametrov pre spermie (napr. morfológia spermie a pohyblivosť) a v preparátoch tkanív dôkladným histopatologickým vyšetrením. Ak sú dostupné údaje o spermatogenéze z predchádzajúcej štúdie pri opakovaných dávkach s dostatočným trvaním, napr. 90-dňová štúdia, nie je potrebné do štúdie zahrnúť samce P generácie. Odporúča sa však, aby sa uchovali vzorky alebo digitálne záznamy spermy P generácie na umožnenie neskoršieho posúdenia. Samiciam P generácie sa podáva testovaná látka počas rastu a v priebehu niekoľkých úplných estrálnych cyklov, aby sa dali stanoviť všetky nepriaznivé účinky testovanej látky na normálny priebeh estrálneho cyklu. Testovaná látka sa podáva rodičom (P) počas ich párenia, počas výslednej gravidity a počas odstavenia ich F_1 potomstva. Po odstavení pokračuje podávanie látky F_1 potomstvu počas ich rastu do dospelosti, párenia a narodenia F_2 generácie až do odstavenia F_2 generácie.

Klinické pozorovania a patologické vyšetrenia sa vykonajú na všetkých zvieratách na príznaky toxicity s osobitným dôrazom na účinky na integritu a činnosť samčích a samičích reprodukčných systémov a na rast a vývoj potomstva.

▼B

1.3. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.3.1. **Výber druhu zvierat**

Na testovanie sa prednostne používa potkan. Je potrebné zdôvodniť použitie iných druhov a budú potrebné príslušné úpravy. Kmene s nízkou plodnosťou, alebo o ktorých je známe, že majú vysoký výskyt vývojových porúch, sa nemajú používať. Na začiatku štúdie má byť rozdiel medzi hmotnosťami použitých zvierat minimálny a nemá byť vyšší ako 20 % priemernej hmotnosti každého pohlavia.

1.3.2. **Podmienky pre umiestnenie a kŕmenie**

Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 °C (± 3 °C). Aj keď relatívna vlhkosť by mala byť aspoň 30 %, a pokiaľ možno, nemala by prevyšovať 70 %, okrem obdobia počas čistenia miestnosti by mala dosahovať 50 – 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé, v rytme 12 hodín svetlo, 12 hodín tma. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Výber krmiva môže byť ovplyvnený potrebou zabezpečiť vhodnú primes testovanej látky, keď sa podáva týmto spôsobom.

Zvieratá môžu byť umiestnené jednotlivo alebo v malých skupinách rovnakého pohlavia v klietkach. Párenie sa uskutoční v klietkach, ktoré sú vhodné na tento účel. Po zaznamenaní kopulácie sa spárené samice umiestnia jednotlivo do pôrodných klietok alebo do klietok pre matky. Spárené potkany sa môžu držať aj v malých skupinách a oddeliť jeden alebo dva dni pred pôrodom. Krátko pre termínom vrhu sa spáreným zvieratám poskytne vhodný a definovaný hniezdiaci materiál.

1.3.3. **Príprava zvierat**

Použijú sa zdravé mladé zvieratá, ktoré sa aklimatizovali na laboratórne podmienky aspoň 5 dní a ktoré sa predtým nepodrobili iným pokusom. Pokusné zvieratá sa charakterizujú na základe druhu, kmeňa, zdroja, pohlavia, hmotnosti a/alebo veku. Je potrebné, aby boli známe všetky súrodenecké vzťahy medzi zvieratami, aby sa zabránilo páreniu medzi súrodencami. Zvieratá sa náhodne rozdelia do kontrolnej a ošetrovanej skupiny (odporúča sa rozdelenie podľa telesnej hmotnosti). Klietky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy kvôli umiestneniu klietok. Každému zvieraťu sa priradí vlastné identifikačné číslo. V prípade P generácie sa to uskutoční pred začiatkom dávkovania. V prípade F_1 generácie sa to uskutoční po odstavení zvierat vybratých na párenie. Pre všetky vybraté F1 zvieratá sa uchovajú záznamy s uvedením vrhu, z ktorého pochádzajú. Okrem toho sa odporúča individuálna identifikácia mláďat čo najskôr po narodení, keď sa posudzuje váženie jednotlivých mláďat alebo funkčné testy.

Rodičia (P) majú byť na začiatku dávkovania vo veku 5 až 9 týždňov. Zvieratá vo všetkých pokusných skupinách majú mať, pokiaľ je to možné, rovnakú hmotnosť a vek.

▼B

1.4. POSTUP

1.4.1. **Počet a pohlavie zvierat**

Každá pokusná a kontrolovaná skupina by mala obsahovať dostatočný počet zvierat tak, aby bolo k dispozícii pokiaľ možno 20 gravidných samíc, ktoré rodia, alebo čoskoro budú rodiť. V prípade látok, ktoré spôsobujú neželateľné účinky v súvislosti s ošetrením (napr. sterilitu, nadmernú toxicitu pri vysokej dávke), toto nie je možné. Cieľom je dosiahnuť dostatok gravidít, aby sa zabezpečilo zmysluplné posúdenie potenciálu látky ovplyvniť fertilitu, graviditu a správanie matky a dojčenie, rast a vývoj F_1 potomstva od počatia do zrelosti a vývoj ich potomstva (F_2) do odstavenia. Preto prípad, keď sa nedosiahne potrebný počet gravidných zvierat (t. j. 20), nevedie nevyhnutne k neplatnosti štúdie a posudzuje sa na základe jednotlivých prípadov.

1.4.2. **Príprava dávok**

Odporúča sa, aby sa testovaná látka podávala orálne (v krmive, pitnej vode alebo sondou), pokiaľ sa iná cesta podávania (napr. dermálna alebo inhalačná) nepokladá za vhodnejšiu.

V prípade potreby sa testovaná látka rozpustí alebo rozptýli vo vhodnom nosiči. Odporúča sa, aby sa vždy, keď je to možné, najskôr zvážilo použitie vodného roztoku/suspenzie, potom roztoku/emulzie v oleji (napr. kukuričný olej) a nakoniec prípadného roztoku v iných nosičoch. Pre nosiče, ktoré sú iné ako voda, musia byť známe toxické charakteristiky. Určí sa stabilita testovanej látky v nosiči.

1.4.3. **Dávkovanie**

Použijú sa aspoň tri veľkosti dávky a uskutoční sa paralelná kontrola. Pokiaľ to fyzikálno-chemické vlastnosti alebo biologické účinky testovanej látky pripúšťajú, zvolí sa najvyššia dávka tak, aby spôsobila toxicitu, ale nespôsobila úmrtie alebo silné utrpenie. V prípade nečakanej úmrtnosti, štúdie s mierou úmrtnosti menej ako približne 10 % u rodičov (P) sú zvyčajne ešte stále akceptovateľné. Klesajúca postupnosť veľkosti dávok sa zvolí tak, aby sa preukázala každá reakcia v závislosti od dávkovania a hladina bez pozorovaného nepriaznivého účinku (NOAEL). Intervaly dávkovania s faktorom dva až štyri sú často optimálne na stanovenie klesajúceho dávkovania a pridanie štvrtej pokusnej skupiny je často vhodnejšie ako používanie veľmi veľkých intervalov (napr. viac ako faktor 10) medzi dávkami. V prípade štúdií týkajúcich sa výživy interval medzi dávkami nemá mať vyšší faktor ako 3. Veľkosti dávok sa zvolia pri zohľadnení všetkých existujúcich údajov o toxicite, najmä výsledky zo štúdií pri opakovaných dávkach. Posúdia sa aj všetky dostupné informácie o metabolizme a kinetike testovanej látky alebo príbuzných materiáloch. Okrem toho napomôžu tieto informácie aj pri preukazovaní vhodnosti režimu dávkovania.

▼B

Kontrolnou skupinou môže byť neošetrená skupina alebo skupina, ktorej sa podáva nosič, ak sa pri podávaní testovanej látky používa nosič. Okrem ošetrenia s testovanou látkou sa so zvieratami v kontrolnej skupine zaobchádza rovnakým spôsobom ako so zvieratami v pokusnej skupine. Ak sa používa nosič, kontrolná skupina dostane nosič v najvyššom používanom objeme. Ak sa testovaná látka podáva v krmive a spôsobuje znížený príjem potravy alebo jej využitia, potom sa usudzuje, že je potrebné použiť paralelne kŕmenú kontrolnú skupinu. Údaje z kontrolných štúdií, určených na posúdenie účinkov zníženej spotreby potravy na reprodukčné parametre, sa alternatívne môžu použiť namiesto paralelne kŕmenej kontrolnej skupiny.

Je potrebné venovať pozornosť týmto charakteristikám nosiča a iných prídavných látok: vplyv na absorpciu, distribúciu, metabolizmus alebo retenciu testovanej látky; vplyv na chemické vlastnosti testovanej látky, ktorý môže meniť jej toxické vlastnosti; a vplyv na spotrebu potravy a vody alebo nutričný stav zvierat.

1.4.4. **Limitný test**

Ak v orálnej štúdii s jednou dávkou s veľkosťou minimálne 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň alebo pri podávaní v krmive alebo pitnej vode rovnaký percentuálny podiel v krmive alebo pitnej vode s použitím postupov opísaných pre túto štúdiu nespôsobí žiadne pozorovateľné toxické účinky ani u rodičov, ani u ich potomstva a ak sa toxicita neočakáva na základe údajov zo štrukturálne a/alebo metabolicky príbuzných látok, potom sa môže upustiť od úplnej štúdie s použitím viacerých veľkostí dávok. Limitný test sa uplatňuje s výnimkou prípadu, keď z expozície ľudí vyplýva, že je potrebné použiť vyššiu orálnu dávku. Pre iné typy podávania, ako je napr. inhalácia alebo dermálna aplikácia z fyzikálno-chemických vlastností testovanej látky, ako je napr. rozpustnosť, často môže vyplývať a byť limitovaná maximálna prípustná úroveň expozície.

1.4.5. **Podávanie dávok**

Zvieratám sa podáva testovaná dávka 7 dní v týždni. Uprednostňuje sa orálna cesta podávania (krmivo, pitná voda alebo sonda). Ak sa použije iný spôsob podávania, uvedie sa zdôvodnenie a môžu byť potrebné príslušné úpravy. Všetkým zvieratám sa podáva látka rovnakým spôsobom počas príslušného obdobia pokusu. Ak sa testovaná látka podáva sondou, je potrebné použiť žalúdočnú sondu. Objem kvapaliny podanej jednorázovo nesmie byť vyšší ako 1 ml/100 g telesnej hmotnosti (0,4 ml/100 g telesnej hmotnosti je maximum pre kukuričný olej), s výnimkou vodných roztokov, keď sa môže použiť 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. S výnimkou dráždivých alebo žieravých látok, ktoré zvyčajne pri vyšších koncentráciách spôsobia zhoršenie účinkov, variabilita v aplikovanom objeme sa minimalizuje tým, že sa koncentrácie upravia tak, aby sa zabezpečil stály objem vo všetkých dávkach. V štúdiách, pri ktorých sa používa sonda, mláďatá zvyčajne dostávajú testovanú látku iba nepriamo v mlieku, pokiaľ sa im po odstavení nezačne látka podávať priamo. V štúdiách, pri ktorých sa látka podáva v krmive alebo pitnej vode, mláďatá dostanú dodatočne testovanú látku priamo, keď začnú jesť samostatne počas posledného obdobia laktácie.

▼B

Pre látky podávané v potrave alebo pitnej vode je dôležité zabezpečiť, aby množstvá použitej testovanej látky neinterferovalo s normálnou výživovou a vodnou bilanciou. Keď sa testovaná látka podáva v krmive môže sa použiť buď stála koncentrácia v krmive (ppm) alebo stála veľkosť dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť zvieraťa; použitá alternatíva sa musí špecifikovať. V prípade, keď sa látka podáva sondou, látka sa podáva približne v rovnaký čas každý deň a prispôsobí sa aspoň raz za týždeň, aby sa zachovala stála veľkosť dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť. Informácie, ktoré sa týkajú placentárnej distribúcie, sa posudzujú pri prispôsobení veľkosti dávky cez sondu založenej na hmotnosti.

1.4.6. **Priebeh pokusu**

Denné podávanie testovanej látky samčej a samičej rodičovskej generácii (P) sa začína, keď sú vo veku 5 až 9 týždňov. Denné podávanie testovanej látky F_1 generácii samcov a samíc sa začína po odstavení; je potrebné pamätať na to, že v prípade, keď sa testovaná látka podáva v krmive alebo pitnej vode, priama expozícia F_1 mláďat testovanou látkou sa môže vyskytnúť už počas laktačného obdobia. Pre obidve pohlavia (P a F_1) pokračuje podávanie látky minimálne 10 týždňov pred obdobím párenia. Podávanie látky pokračuje u oboch pohlaví počas 2-týždňového obdobia párenia. Samce sa humánnym spôsobom usmrtia a vyšetria, ak už nie sú potrebné na hodnotenie účinkov na reprodukciu. Rodičovskej generácii samíc (P) pokračuje podávanie látky počas gravidity a až do odstavenia F_1 potomstva. Je potrebné venovať pozornosť úpravám harmonogramu dávkovania založeným na dostupných informáciách o testovanej látke vrátane existujúcich údajov o toxicite, vplyve na metabolizmus alebo bioakumulácii. Dávka pre jednotlivé zviera sa zvyčajne zakladá na naposledy zistenej telesnej hmotnosti. Je však potrebné venovať pozornosť pri nastavovaní dávky počas posledného trimestra gravidity.

Ošetrovanie samcov a samíc generácie P a F_1 pokračuje až do ukončenia. Všetky dospelé samce a samice generácie P a F_1 sa humánnym spôsobom usmrtia, ak už viac nie sú potrebné na hodnotenie účinkov na reprodukciu. Potomstvo generácie F_1, ktoré sa nevyberie na párenie, a celé potomstvo generácie F_2 sa po odstavení humánnym spôsobom usmrtí.

1.4.7. **Párenie**

1.4.7.1. *Párenie rodičov (P)*

V prípade každého párenia sa umiestni každá samica s jedným samcom z rovnakej dávkovej skupiny (párenie 1:1), pokiaľ sa neuskutoční kopulácia, alebo neuplynú 2 týždne. Každý deň sa samice vyšetria na prítomnosť spermy alebo vaginálnej zátky. Za 0. deň gravidity sa určí deň, kedy sa zistil výskyt vaginálnej zátky alebo spermy. V prípade neúspešného párenia sa zváži opätovné párenie samíc so samcami z rovnakej skupiny s preukázanou plodnosťou. Vzájomne spárené páry sa v údajoch zreteľne identifikujú. Je potrebné zabrániť páreniu súrodencov.

▼B

1.4.7.2. *Párenie F_1 generácie*

Pre párenie F_1 potomstva sa z každého vrhu po odstavení vyberie aspoň jeden samec a jedna samica na párenie s mláďatami tej istej dávkovej skupiny, ale z iného vrhu, aby sa vytvorila F_2 generácia. Výber mláďat z každého vrhu je náhodný, ak sa nezistili žiadne významné odlišnosti telesnej hmotnosti alebo vzhľade zvierat z vrhu. V prípade, že sa zistia tieto odlišnosti, vyberú sa najlepší zástupcovia z každého vrhu. Prakticky je to najlepšie na základe telesnej hmotnosti, ale môže to byť vhodnejšie na základe vzhľadu. F_1 potomstvo by sa nemalo pariť, pokiaľ nedosiahne úplnú pohlavnú zrelosť.

Páry bez potomstva sa vyšetria, aby sa určila zjavná príčina neplodnosti. Toto môže zahrnovať také postupy, ako napr. ďalšie možnosti pariť sa s inými samcami alebo samicami s preukázanou plodnosťou, mikroskopické vyšetrenie reprodukčných orgánov a vyšetrenie estrálnych cyklov alebo spermatogenézy.

1.4.7.3. *Druhé párenie*

V určitých prípadoch, ako napr. zmeny vo veľkosti vrhu súvisiace s ošetrením alebo zistenie nejednoznačného účinku pri prvom párení, sa odporúča, aby sa dospelé zvieratá P alebo F_1 generácie opätovne spárili na vytvorenie druhého vrhu. Odporúča sa opätovné spárenie samíc alebo samcov, ktoré nevytvorili vrh so zvieratami opačného pohlavia s preukázanou plodnosťou. Ak sa pokladá za potrebné, aby sa uskutočnil druhý vrh v ktorejkoľvek generácii, zvieratá sa opätovne spária jeden týždeň po odstavení posledného vrhu.

1.4.7.4. *Veľkosť vrhu*

Zvieratám sa umožní, aby vrhli prirodzeným spôsobom a vychovávali svoje potomstvo až do odstavenia. Štandardizácia veľkostí vrhu je nepovinná. Ak sa uskutoční štandardizácia, použitá metóda sa detailne popíše.

1.5. POZOROVANIA

1.5.1. **Klinické vyšetrenia**

Všeobecné klinické vyšetrenie sa uskutoční každý deň a v prípade podávania dávok cez sondu je potrebné, aby načasovanie zohľadnilo predpokladané maximálne účinky po podaní dávky. Zmeny v správaní, príznaky ťažkého alebo dlhotrvajúceho pôrodu a všetky príznaky toxicity sa zaznamenajú. Ďalšie podrobnejšie vyšetrenie každého zvieraťa sa uskutoční aspoň raz do týždňa a môže sa to zvyčajne urobiť počas váženia zvieraťa. Dvakrát za deň, počas víkendu raz za deň sa v prípade potreby u všetkých zvierat zisťuje morbidita a mortalita.

▼B

1.5.2. **Telesná hmotnosť a spotreba potravy/vody rodičovských zvierat**

Rodičovské zvieratá (P a F_1) sa odvážia v prvý deň po podaní látky a potom aspoň raz za týždeň. Rodičovské samice (P a F_1) sa odvážia minimálne v dňoch gravidity 0, 7, 14 a 20 alebo 21 a počas laktácie v rovnaké dni ako sa vážia mláďatá z vrhov a v deň, keď sa zvieratá usmrtia. Tieto zistenia sa zaznamenajú jednotlivo pre každé dospelé zviera. V čase pred obdobím párenia a graviditou sa spotreba krmiva meria minimálne raz za týždeň. Spotreba vody sa meria minimálne raz do týždňa, ak sa testovaná látka podáva vo vode.

1.5.3. **Estrálny cyklus**

Dĺžka estrálneho cyklu a normálny priebeh sa zisťuje u samíc P a F_1 generácie vaginálnymi výtermi pred párením a nepovinne počas párenia, pokiaľ sa nepotvrdí spárenie. Pri odbere vaginálnych/-cervikálnych buniek je potrebné venovať pozornosť, aby sa neporušila sliznica a následne nevyvolala pseudogravidita (1).

1.5.4. **Parametre spermií**

Pre všetky samce P a F_1 generácie sa po usmrtení zaznamená hmotnosť semenníkov a nadsemenníkov a odloží sa po jednom z každého orgánu na histopatologické vyšetrenie (pozri oddiel 1.5.7, 1.5.8.1). Z časti pozostávajúcej z aspoň desiatich samcov z každej skupiny samcov generácie P a F_1 sa zostávajúce semenníky a nadsemenníky použijú na zistenie počtu spermatidov homogenizačne rezistentných, prípadne zásob spermií z chvostovej časti nadsemenníkov. V prípade tejto istej časti samcov, sa spermie z chvostovej časti nadsemenníkov alebo semenovodu odoberú na vyšetrenie pohyblivosti a morfológie spermií. Ak sa zistia účinky v súvislosti s ošetrením, alebo ak existuje dôkaz z iných štúdií o možných účinkoch na spermatogenézu, hodnotenie spermií sa uskutoční u všetkých samcov v každej dávkovej skupine; v opačnom prípade sa môže výpočet obmedziť na samce P a F_1 generácie z kontrolnej skupiny a skupiny s vysokými dávkami.

Zistí sa celkový počet homogenizačne rezistentných spermatidov a spermií z chvostovej časti nadsemenníkov (2) (3). Zásoby spermií z chvostovej časti nadsemenníkov sa odvodia na základe koncentrácie a objemu spermií v suspenzii použitej na doplnenie kvalitatívnych hodnotení a počtu spermií získaných následným pomletím a/-alebo homogenizáciou zvyšného tkaniva chvostovej časti. Počet sa zistí u vybratej podskupiny samcov všetkých dávkových skupín bezprostredne po usmrtení zvierat, pokiaľ sa neurobia video alebo digitálne záznamy, alebo pokiaľ sa vzorky nezamrazia a neanalyzujú neskôr. V týchto prípadoch sa môže ako prvá analyzovať kontrolná skupina a skupina s vysokou dávkou. Ak sa nezistia žiadne účinky v súvislosti s ošetrením (napr. účinky na počet spermií, pohyblivosť alebo morfológiu), ostatné dávkové skupiny nie je potrebné analyzovať. Ak sa zaznamenajú účinky v súvislosti s ošetrením v skupine s vysokými dávkami, potom sa skupiny s nižšími dávkami tiež posúdia.

▼B

Posúdi sa pohyblivosť spermií v nadsemenníkoch (alebo semenovode), alebo sa zaznamená na video pásku bezprostredne po usmrtení. Spermie sa odoberú tak, aby sa minimalizovalo poškodenie a zriedia, aby sa mohla vykonať analýza pohyblivosti s použitím uznaných metód (4). Percento progresívne pohybujúcich sa spermií sa stanoví buď subjektívne alebo objektívne. Ak sa uskutočňuje počítačová analýza pohyblivosti (5) (6) (7) (8) (9) (10), odvodenie progresívnej pohyblivosti sa zakladá na maximálnych hodnotách definovaných užívateľom pre priemernú rýchlosť dráhy a priamosť alebo lineárny index. Ak sa vzorky nahrávajú na videopásky (11), alebo sa obrazy inak zaznamenávajú počas autopsie, môže sa vykonať následná analýza iba kontrolnej skupiny a skupiny s vysokými dávkami samcov generácie P a F_1, pokiaľ sa nezistia účinky v súvislosti s ošetrením; v takomto prípade sa posúdia aj skupiny s nižšími dávkami. Pri neprítomnosti video alebo digitálnych záznamov sa všetky vzorky vo všetkých ošetrovaných skupinách analyzujú pri autopsii.

Uskutoční sa morfologické vyšetrenie spermií zo vzorky z nadsemenníkov (alebo semenovodu). Spermie (minimálne 200 na vzorku) sa vyšetria ako fixné, mokré preparáty (12) a zatriedia sa ako buď normálne alebo abnormálne. Vzorky morfologických abnormalít spermií zahrnujú fúziu, oddelené hlavičky a zdeformované hlavičky a/alebo bičíky. Vyšetrenie sa vykoná na vybratej podskupine samcov všetkých dávkových skupín buď bezprostredne po usmrtení zvierat, alebo neskôr na základe video alebo digitálnych záznamov. Stery po fixovaní sa tiež môžu posúdiť neskôr. V týchto prípadoch sa môže ako prvá analyzovať kontrolná skupina a skupina s vysokou dávkou. Ak sa nepozorujú žiadne účinky v súvislosti s ošetrením (napr. účinky na morfológiu spermií), ostatné dávkové skupiny nie je potrebné analyzovať. Ak sa zaznamenajú účinky v súvislosti s ošetrením v skupine s vysokými dávkami, potom sa skupiny s nižšími dávkami tiež posúdia.

Ak sa horeuvedené parametre hodnotenia spermií už preskúmali ako súčasť štúdie systémovej toxicity o dĺžke aspoň 90 dní, nie je ich potrebné zopakovať v dvojgeneračnej štúdii. Odporúča sa však, aby sa uchovali vzorky alebo digitálne záznamy spermií P generácie na umožnenie neskoršieho posúdenia v prípade potreby.

1.5.5. **Potomstvo**

Každý vrh sa vyšetrí čo najskôr po pôrode (0. deň laktácie), aby sa zistil počet a pohlavie potomstva, mŕtvo narodené a živo narodené jedince a výskyt nápadných anomálií. Mláďatá, ktoré sa našli mŕtve v deň 0, ak nie sú macerované, sa prednostne vyšetria na možné poruchy a príčinu uhynutia a sa zakonzervujú. Živé mláďatá sa spočítajú a každé sa jednotlivo po narodení odváži (0. deň laktácie) alebo na 1. deň a potom pravidelne v deň váženia, napr. na 4., 7., 14. a 21. deň laktácie. Fyzické abnormality a poruchy správania pozorované u matiek alebo potomstva sa zaznamenajú.

▼B

Fyzický vývoj potomstva sa zaznamená najmä na základe prírastku telesnej hmotnosti. Ostatné fyzické parametre (napr. otvorenie očí a uší, prerezanie zubov, rast srsti) môžu poskytnúť doplňujúce informácie, ale tieto údaje sa hodnotia prednostne v súvislosti s údajmi o sexuálnej zrelosti (napr. vek a telesná hmotnosť v čase otvorenia vagíny alebo oddelenia žaluďa a predkožky) (13). Vyšetrenia funkčnosti (napr. motorická aktivita, zmyslové funkcie, reflexná ontogenézia) F_1 potomstva pred a/alebo po odstavení predovšetkým tie, ktoré sa týkajú sexuálnej zrelosti, sa odporúčajú, ak takéto vyšetrenia nie sú zahrnuté v samostatných štúdiách. Vek v čase vaginálneho otvorenia a oddelenia predkožky sa určí pre odstavené zvieratá generácie F_1 vybraté pre párenie. Anogenitálna vzdialenosť sa zmeria v deň 0 po narodení u mláďat generácie F_2, ak sa vyskytnú zmeny v pomere pohlaví u generácie F_1 alebo v čase pohlavnej zrelosti.

Vyšetrenia funkčnosti sa môžu vynechať v skupinách, v ktorých sa iným spôsobom prejavili jasné príznaky nepriaznivých účinkov (napr. významný pokles prírastku hmotnosti atď.). Ak sa uskutočňujú vyšetrenia funkčnosti, neuskutočnia sa na mláďatách vybratých na párenie.

1.5.6. **Autopsia**

V čase usmrtenia alebo uhynutia počas štúdie sa všetky rodičovské zvieratá (P a F_1 generácie), všetky mláďatá s externými abnormalitami alebo klinickými príznakmi, ako aj po jednom náhodne vybratom mláďati/pohlaví/vrhu z F_1 a aj F_2 generácie vyšetria makroskopicky na všetky štrukturálne abnormality alebo patologické zmeny. Osobitná pozornosť sa venuje orgánom reprodukčného systému. Moribundné mláďatá sa humánnym spôsobom usmrtia a uhynuté mláďatá, ak nie sú macerované, sa vyšetria na možné defekty a/alebo príčinu uhynutia a zakonzervujú.

Maternice všetkých samíc, ktoré prvý raz rodili, sa vyšetria spôsobom, ktorý neovplyvní histopatologické vyšetrenie, na výskyt a počet implantačných miest.

1.5.7. **Hmotnosť orgánov**

V čase usmrtenia sa zistí telesná hmotnosť týchto orgánov všetkých rodičovských zvierat P a F_1 generácie (párové orgány sa vážia jednotlivo):

— uterus, vaječníky,

— semenníky, nadsemenníky (celé a chvostová časť),

— prostata,

— semenné vačky s koagulačnými žľazami a ich tekutiny a prostata (ako jedna jednotka),

— mozog, pečeň, obličky, slezina, hypofýza, štítna žľaza a nadobličky a známe cieľové orgány.

Zistia sa konečné telesné hmotnosti mláďat generácie F_1 a F_2 vybratých na autopsiu. U jedného náhodne vybratého mláďaťa/pohlavia/vrhu sa odvážia tieto orgány (pozri časť 1.5.6): mozog, slezina a týmus.

▼B

Výsledky autopsie a hmotnosti orgánov sa posúdia v súvislosti so zisteniami z iných štúdií pri opakovaných dávkach, ak je to možné.

1.5.8. **Histopatológia**

1.5.8.1. *Rodičovské zvieratá*

Tieto orgány a tkanivá rodičovských zvierat (P a F_1) alebo ich reprezentatívne vzorky sa fixujú a uchovajú vo vhodnom médiu na histopatologické vyšetrenie:

— vagína, uterus s cervixom a vaječníky (zakonzervované vo vhodnom fixačnom prostriedku),

— jeden semenník (konzervovaný v Bouinovom roztoku alebo porovnateľnom fixačnom prostriedku), jeden nadsemenník, semenné vačky, prostata a koagulačná žľaza,

— predtým identifikovaný cieľový orgán(-y) zo všetkých zvierat P a F_1 generácie vybratých na párenie.

Úplné histopatologické vyšetrenie zakonzervovaných hore uvedených orgánov a tkanív sa uskutoční u všetkých zvierat zo skupiny s vysokými dávkami a z kontrolnej skupiny generácie P a F_1 vybratých na párenie. Vyšetrenie vaječníkov zvierat P generácie je nepovinné. Orgány vykazujúce zmeny v súvislosti s ošetrením sa tiež vyšetria v skupinách s nízkymi a strednými dávkami na pomoc pri stanovení NOAEL. Ďalej sa podrobia histopatologickému vyšetreniu reprodukčné orgány zvierat zo skupín s nízkymi a strednými dávkami s podozrením na zníženú fertilitu, napr. tie, ktoré zlyhali pri párení, počatí, plodení alebo vrhnutí zdravého potomstva, alebo u ktorých bol ovplyvnený estrálny cyklus alebo počet spermií, pohyblivosť alebo morfológia. Všetky makroskopické lézie ako napr. atrofia alebo tumory sa vyšetria.

Semenníky sa podrobne histopatologicky vyšetria (napr. s použitím Bouinovho fixačného prostriedku, zaliatia v parafíne a transverzálnych rezov s hrúbkou 4 – 5 um) na identifikáciu účinkov, ktoré boli spôsobené v súvislosti s ošetrením, ako sú napr. retencia spermatidov, chýbajúce vrstvy zárodočných buniek alebo typy, mnohojadrové obrovské bunky alebo olupovanie spermatogénnych buniek do lumenu (14). Vyšetrenie intaktných nadsemenníkov zahrnuje hlavu, telo a chvostovú časť, ktoré sa môže vykonať na základe posúdenia pozdĺžneho rezu. Nadsemenníky sa vyšetria na infiltráciu leukocytov, zmenu prevalencie typov buniek, aberantných typov buniek a fagocytózu spermií. PAS a farbenie hematoxylínom sa môže použiť na vyšetrenie samčích reprodukčných orgánov.

Vaječník po odstavení má obsahovať primordiálne a rastúce folikuly, ako aj veľké žlté teliesko obdobia laktácie. Histopatologickým vyšetrením sa má zistiť kvalitatívny úbytok primordiálnych folikúl. Kvantitatívne hodnotenie primordiálnych folikúl sa uskutoční pre samice F1 generácie; počet zvierat, výber rezu vaječníkov a výber veľkosti vzoriek má byť štatisticky primeraný na posúdenie použitej metódy. Do vyšetrenia sa zahrnie stanovenie počtu primordiálnych folikúl, ktoré sa môžu kombinovať s malými rastúcimi folikulami na porovnanie ošetrených a kontrolných vaječníkov (15) (16) (17) (18) (19).

▼B

1.5.8.2. *Odstavené zvieratá*

Makroskopicky abnormálne tkanivo a cieľové orgány zo všetkých mláďat s vonkajšími abnormalitami alebo klinickými príznakmi, ako aj na jednom z náhodne vybratom mláďati/pohlaví/vrhu z oboch generácií F_1 a F_2, ktoré neboli vybraté na párenie, sa zafixuje a uchová vo vhodnom médiu na histopatologické vyšetrenie. Úplná histopatologická charakterizácia zakonzervovaného tkaniva sa uskutoční s osobitným dôrazom na orgány reprodukčného systému.

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Údaje sa zaprotokolujú jednotlivo a zosumarizujú vo forme tabuliek a uvedie sa pre každú pokusnú skupinu a každú generáciu počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat, ktoré sa našli uhynuté počas testu, alebo sa usmrtili z humánnych dôvodov, čas každého úmrtia alebo humánneho usmrtenia, počet fertilných samíc, počet gravidných samíc, počet zvierat vykazujúcich príznaky toxicity, popis zistených príznakov toxicity, vrátane času nástupu, trvania a závažnosti každého toxického účinku, typy vyšetrení rodičov a potomstva, typy histopatologických zmien a všetky údaje, ktoré sa týkajú vrhu.

Číselné výsledky sa vyhodnotia príslušnou všeobecne uznávanou štatistickou metódou; ako súčasť plánu štúdie by sa mali zvoliť štatistické metódy, ktoré by sa mali zdôvodniť. Na analýzu údajov môžu byť užitočné štatistické modely reakcie na podanie dávky. Správa by mala obsahovať dostatok informácií o analytickej metóde a použitom počítačovom programe, aby nezávislý kontrolór/štatistik mohol prehodnotiť a zrekonštruovať analýzu.

2.2. VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV

Zistenia z tejto štúdie dvojgeneračnej reprodukčnej toxicity by sa mali vyhodnotiť na základe zistených účinkov vrátane autopsie a mikroskopických nálezov. Hodnotenie bude zahrnovať vzťah alebo jeho absenciu medzi dávkou testovanej látky a prítomnosť alebo absenciu výskytu a závažnosti abnormalít, vrátane makroskopických lézií, identifikovaných cieľových orgánov, ovplyvnenej fertility, klinických abnormalít, ovplyvnenej reprodukčnej činnosti a schopnosti vrhnúť, zmien telesnej hmotnosti, účinkov na mortalitu a iných toxických účinkov. Pri hodnotení výsledkov testu by sa mali zohľadniť fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej látky a, ak sú dostupné, toxikokinetické údaje.

Riadne vykonaný test reprodukčnej toxicity by mal poskytnúť uspokojivé stanovenie hladiny, ktorá nevyvoláva účinky, a umožniť pochopenie nepriaznivých účinkov na reprodukciu, pôrod, laktáciu, postnatálny vývoj vrátane rastu a sexuálneho vývoja.

▼B

2.3. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Štúdia dvojgeneračnej reprodukčnej toxicity poskytne informácie o účinkoch opakovanej expozície látkou počas všetkých fáz reprodukčného cyklu. Štúdia poskytuje informácie predovšetkým o reprodukčných parametroch a o vývoji, raste, dozrievaní a prežívaní potomstva. Výsledky štúdie by sa mali interpretovať v spojitosti so zisteniami zo subchronických štúdií, štúdií prenatálneho vývoja, toxikokinetických a iných dostupných štúdií. Výsledky tejto štúdie sa môžu použiť pri posudzovaní potreby ďalšieho testovania chemikálie. Extrapolácia výsledkov štúdie na človeka platí len obmedzene. Najlepšie slúžia na poskytnutie informácií o NOAEL a prípustnej expozície ľudí (20) (21) (22) (23).

3. **PODÁVANIE SPRAV**

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

— fyzikálny charakter a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikačné údaje,

— čistota.

Nosič (v prípade potreby):

— zdôvodnenie výberu nosiča, ak je iný ako voda.

Pokusné zvieratá:

— použitý druh/kmeň,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky umiestnenia, krmivo, hniezdiaci materiál atď.,

— hmotnosti jednotlivých zvierat na začiatku testu.

Podmienky testu:

— zdôvodnenie výberu veľkosti dávok;

— údaje o príprave zloženia testovanej látky/krmiva, dosiahnutých koncentráciách;

— stabilita a homogenita prípravku,

— údaje o podávaní testovanej látky,

— prepočet koncentrácie testovanej látky v krmive/pitnej vode (ppm) na dosiahnutú dávku (mg/kg telesnej hmotnosti/deň), ak je potrebné,

— údaje o kvalite krmiva a vody.

▼B

Výsledky:

— spotreba potravy a spotreba vody, ak sú k dispozícii, účinnosť krmiva (prírastok telesnej hmotnosti na gram skonzumovanej potravy) a spotreba testovaného materiálu pre zvieratá generácie P a F_1, okrem obdobia párenia a aspoň posledných troch mesiacov laktácie,

— údaje o absorpcii (ak sú k dispozícii),

— údaje o telesnej hmotnosti zvierat P a F_1 generácie vybratých na párenie,

— údaje o hmotnosti vrhu a mláďat,

— telesná hmotnosť pri usmrtení a údaje o absolútnych a relatívnych hmotnostiach orgánov rodičov,

— povaha, závažnosť a trvanie klinických vyšetrení (s údajmi o reverzibilite),

— čas uhynutia počas štúdie, alebo či zvieratá prežili do usmrtenia,

— údaje o toxickej reakcii podľa pohlavia a dávky, vrátane indexov pre párenie, fertilitu, graviditu, pôrod, životaschopnosť a laktáciu; v správe je potrebné uviesť čísla použité na výpočet týchto indexov,

— toxické alebo iné účinky na reprodukciu, potomstvo, postnatálny rast atď.,

— nálezy z autopsie,

— podrobný popis všetkých histopatologických nálezov,

— počet samíc generácie P a F_1 s normálnym cyklom a trvanie cyklu,

— celkový počet spermií z chvostovej časti nadsemenníkov, percento progresívne sa pohybujúcich spermií, percento morfologicky normálnych spermií a percento spermií s každou identifikovanou abnormalitou,

— čas do inseminácie, vrátane počtu dní do inseminácie,

— dĺžka gravidity,

— počet implantátov, žlté telieska (corpora lutea), veľkosť vrhu,

— počet živo narodených zvierat a straty po implantácii,

— počet mláďat s makroskopicky viditeľnými abnormalitami, ak je zistený počet nevyvinutých jedincov je potrebné uviesť,

— údaje o fyzických medzníkoch vo vývoji mláďat a iné postnatálne údaje o vývoji; hodnotené fyzické medzníky sa zdôvodnia,

— údaje o vyšetreniach funkčnosti u mláďat a dospelých, ak je možné,

— štatistické spracovanie výsledkov v prípade potreby.

▼B

Diskusia k výsledkom.

Závery, vrátane hodnôt NOAEL pre matku a potomstvo.

4. **ODKAZY**

(1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: *Reproduction in Mammals:* I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.

(2) Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12: 92–108.

(3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54: 103–107.

(4) Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5: 39–44.

(5) Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10(3): 237–244.

(6) Chapin, R.E. et al., (1992).Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6: 267–273.

(7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration. *Journal of Andrology* 13: 409–421.

(8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5: 449–458.

(9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: *Methods in Toxicology*, Part A., Academic, Orlando, Florida, pp. 319–333.

(10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. Journal of Andrology 10: 401–415.

(11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. Journal of Andrology 8: 330–337.

(12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. Reproductive Toxicology 6: 491–505.

(13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. Biological Reproduction 17: 298–303.

(14) Russell, L.D. et al., (1990). Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, Cache River Press, Clearwater, Florida.

(15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, Methods in Toxicology, Academic, Orlando, Florida.

(16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: Growth Factors and the Ovary, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421–426.

(17) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.

▼B

(18) Smith, B.J. et al,. (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. Reproductive Toxicology 5: 379–383.

(19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment, G. Daston,. and C. A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.

(20) Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: Casarett and Doull's Toxicology, M.O. Amdur, J. Doull, and CD. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.

(21) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: Principles and Methods of Toxicology, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.

(22) Palmer, A.K. (1981). In: Developmental Toxicology, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.

(23) Palmer, A.K. (1978). In Handbook of Teratology, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

▼M4

B.36. **TOXIKOKINETIKA**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s OECD TG 417 (2010). Štúdie skúmajúce toxikokinetiku (TK) testovanej chemikálie sa vykonávajú s cieľom získať primerané informácie o jej absorpcii, distribúcii, biotransformácii (t. j. metabolizme) a exkrécii, aby bolo možné ľahšie priradiť koncentráciu alebo dávku k pozorovanej toxicite a lepšie pochopiť jej mechanizmus toxicity. TK môže pomôcť porozumieť toxikologickým štúdiám tak, že preukáže, že pokusné zvieratá sú systémovo vystavené účinkom testovanej chemikálie, a zistí cirkulujúce podiely (materská chemikália/metabolity). Základné TK parametre určené na základe týchto štúdií poskytnú aj informácie o potenciáli akumulácie testovanej chemikálie v tkanivách a/alebo v orgánoch a o potenciáli indukcie biotransformácie ako dôsledku expozície testovanej chemikálii.

2. TK údaje môžu pomôcť pri hodnotení vhodnosti a významnosti údajov o toxicite pri zvieratách na účely extrapolácie hodnotenia nebezpečnosti a/alebo rizík pre človeka. Okrem toho toxikokinetické štúdie môžu priniesť užitočné informácie na stanovenie úrovní dávok pre štúdie toxicity (lineárna alebo nelineárna kinetika), zistenie účinkov spôsobu podávania, biodostupnosti a otázok spojených s prípravou štúdie. Niektoré druhy TK údajov možno použiť pri vývoji fyziologicky založených toxikokinetických (PBTK) modelov.

3. Dôležité využitie údajov o metabolitoch/TK údajov predstavuje napríklad predpovedanie možnej toxicity a druhu pôsobenia a ich vzťahu k úrovni dávky a spôsobu expozície. Okrem toho môžu údaje o metabolizme poskytnúť informácie, ktoré sú užitočné pri hodnotení toxikologického významu expozície pre exogénne vytvárané metabolity testovanej chemikálie.

4. Vhodné toxikokinetické údaje sú užitočné pri zabezpečovaní ďalšej prijateľnosti a použiteľnosti kvantitatívnych vzťahov štruktúry a aktivity, krížových alebo skupinových prístupov pri hodnotení bezpečnosti chemikálií. Kinetické údaje sa môžu využiť aj pri hodnotení toxikologickej významnosti iných štúdií (napr. *in vivo*/*in vitro*).

5. Pokiaľ sa neuvádza iný spôsob podávania (pozri najmä odseky 74 – 78), táto testovacia metóda sa používa v prípade orálneho podávania testovanej chemikálie.

ÚVODNÉ ÚVAHY

6. Regulačné systémy majú na rôzne triedy chemikálií (napr. pesticídy, biocídy, priemyselné chemikálie) rôzne požiadavky a potreby týkajúce sa merania ukazovateľov a parametrov súvisiacich s toxikokinetikou. Na rozdiel od väčšiny testovacích metód je v tejto testovacej metóde opísané testovanie toxikokinetiky, ktoré zahŕňa viacero meraní a parametrov. V budúcnosti môžu byť vypracované nové testovacie metódy a/alebo usmerňovacie dokumenty, ktoré budú opisovať každý parameter samostatne a podrobnejšie. V prípade tejto testovacej metódy závisí otázka, ktoré testy alebo hodnotenia sa vykonávajú, od požiadaviek a/alebo potrieb jednotlivých regulačných systémov.

▼M4

7. Existuje mnoho štúdií, ktoré sa môžu vykonať na regulačné účely s cieľom posúdiť TK správanie testovanej chemikálie. V závislosti od konkrétnych regulačných potrieb alebo situácií však nemusia byť všetky tieto štúdie na posúdenie testovanej chemikálie nutné. Pri príprave toxikokinetických štúdií je potrebná flexibilita, pričom sa zohľadnia charakteristiky skúmanej testovanej chemikálie. V niektorých prípadoch môže byť na zistenie nebezpečnosti a rizík spojených s testovanou chemikáliou potrebné preskúmať iba určitý súbor otázok. V určitých situáciách možno údaje TK zozbierať v rámci hodnotenia v iných toxikologických štúdiách. V iných situáciách môžu byť potrebné ďalšie a/alebo rozsiahlejšie TK štúdie v závislosti od regulačných potrieb a/alebo v prípade, že sa v rámci hodnotenia testovanej chemikálie objavia nové otázky.

8. Pred samotným vykonaním štúdie testovacie laboratórium zváži všetky dostupné informácie o testovanej chemikálii, relevantných metabolitoch a analógoch s cieľom zlepšiť kvalitu štúdie a predísť zbytočnému využívaniu zvierat. Toto zváženie sa môže týkať údajov získaných pomocou iných relevantných testovacích metód (štúdie *in vivo*, štúdie *in vitro* a/alebo hodnotenia *in silico*). Fyzikálno-chemické vlastnosti, ako je napríklad rozdeľovací koeficient oktanol – voda (vyjadrený ako log P_{ow}), pKa, rozpustnosť vo vode, tlak pary a molekulová hmotnosť chemikálie, môžu byť užitočné pri plánovaní štúdie a interpretácii výsledkov. Možno ich stanoviť pomocou vhodných metód, ktoré sú opísané v príslušných testovacích metódach.

OBMEDZENIA

9. Táto testovacia metóda nie je určená pre prípad osobitných okolností, ako sú gravidné zvieratá alebo zvieratá v laktácii a mláďatá, ani na hodnotenie potenciálnych rezíduí pri exponovaných zvieratách určených na produkciu potravín. Údaje získané pomocou štúdie B.36 však môžu poskytnúť základné informácie na plánovanie konkrétnych štúdií na účely takéhoto vyšetrovania. Táto testovacia metóda nie je určená na testovanie nanomateriálov. Zo správy o predbežnej revízii usmernení OECD na vykonávanie testov, pokiaľ ide o ich použiteľnosť v prípade nanomateriálov, vyplýva, že usmernenia TG 417 (rovnocenné s touto testovacou metódou B.36) nie je možné použiť v prípade nanomateriálov (1).

VYMEDZENIE POJMOV

10. Vymedzenie pojmov použitých na účely tejto testovacej metódy je uvedené v dodatku.

OTÁZKA DOBRÝCH ŽIVOTNÝCH PODMIENOK ZVIERAT

11. Usmernenia o humánnom zaobchádzaní so zvieratami sú k dispozícii v usmerňovacom dokumente OECD (GD) č. 19 (2). Odporúča sa preštudovať si dokument OECD GD 19 v prípade všetkých štúdií *in vivo* a *in vitro* opísaných v rámci tejto testovacej metódy.

OPIS METÓD

Pilotné štúdie

12. Pri výbere experimentálnych parametrov pre štúdie toxikokinetiky (napr. metabolizmus, hmotnostná bilancia, analytické postupy, stanovenie dávok, exhalácia CO_2 atď.) sa dôrazne odporúča použitie pilotných štúdií. Na charakterizáciu niektorých týchto parametrov nemusí byť potrebné použitie rádiooznačených chemikálií.

▼M4

Výber zvierat

Druh

13. Druh (a kmeň) zvierat použitých na TK testovanie by podľa možnosti mal byť rovnaký ako druh (a kmeň) použitý v ostatných toxikologických štúdiách vykonaných s použitím skúmanej testovanej chemikálie. Zvyčajne sa používa potkan, lebo tento druh sa pri toxikologických štúdiách využíva vo veľkej miere. Iné alebo ďalšie druhy sa môžu použiť, ak kritické toxikologické štúdie pri týchto druhoch preukazujú významnú toxicitu alebo ak sa preukáže, že ich toxicita/toxikokinetika má väčší význam pre ľudí. Výber druhu a kmeňa zvierat je potrebné odôvodniť.

14. Pokiaľ nie je uvedené inak, v tejto testovacej metóde je testovaným živočíšnym druhom potkan. Určité aspekty metódy sa možno v prípade použitia iného testovacieho druhu budú musieť pozmeniť.

Vek a kmeň

15. Použijú sa mladé zdravé dospelé zvieratá (zvyčajne vo veku 6 – 12 týždňov v čase dávkovania) (pozri aj odseky 13 a 14). Použitie zvierat, ktoré nie sú mladé a dospelé jedince, je potrebné odôvodniť. Všetky zvieratá by mali mať na začiatku štúdie približne rovnaký vek. Variácia hmotnosti jednotlivých zvierat by nemala presiahnuť ± 20 % strednej hmotnosti v testovacej skupine. Podľa možnosti by použitý kmeň mal byť rovnaký ako kmeň použitý pri tvorbe toxikologickej databázy pre testovanú chemikáliu.

Počet a pohlavie zvierat

16. Pri každej testovanej dávke sa použijú najmenej štyri zvieratá z jedného pohlavia. Výber pohlavia použitých zvierat je potrebné odôvodniť. Použitie oboch pohlaví (štyri samce a štyri samice) sa zváži, ak existujú dôkazy svedčiace o významných rozdieloch v toxicite, ktoré súvisia s pohlavím.

Podmienky umiestnenia a kŕmenia

17. Zvieratá sú počas obdobia testovania zvyčajne umiestnené samostatne. Za osobitných okolností môže byť opodstatnené umiestnenie v skupinách. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Teplota miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 °C (± 3 °C) a relatívna vlhkosť by mala byť 30 – 70 %. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody.

Testovaná chemikália

18. V prípade aspektov štúdie súvisiacich s hmotnostnou bilanciou a identifikáciou metabolitov sa použije testovaná chemikália rádiooznačená pomocou ^{14}C. Ak však možno preukázať, že:

— hmotnostnú bilanciu a identifikáciu metabolitov možno primerane posúdiť pomocou neoznačenej testovanej chemikálie,

— analytická špecifickosť a citlivosť použitej metódy s využitím nerádioaktívnej testovanej chemikálie je rovnaká alebo väčšia ako analytická špecifickosť a citlivosť, ktorú možno získať pomocou rádiooznačenej testovanej chemikálie,

▼M4

potom sa nemusí použiť rádiooznačená testovaná chemikália. Okrem toho možno použiť iné rádioaktívne a stabilné izotopy, najmä ak daný prvok vyvoláva alebo prispieva k toxickej zložke testovanej chemikálie. Ak je to možné, rádiooznačenie by sa malo nachádzať v ústrednej časti molekuly, ktorá je metabolicky stabilná (nie je zameniteľná, neodstráni sa metabolicky ako CO_2 a nestane sa súčasťou jednouhlíkového lôžka organizmu). Označenie viacerých miest alebo špecifických oblastí molekuly môže byť potrebné pri sledovaní metabolickej premeny testovanej chemikálie.

19. Rádiooznačené testované chemikálie a testované chemikálie, ktoré nie sú rádiooznačené, sa analyzujú pomocou vhodných metód na určenie ich čistoty a identity. Rádiočistota rádioaktívnej testovanej chemikálie by mala byť najvyššia, ktorú možno pri danej testovanej chemikálii dosiahnuť (v ideálnom prípade by mala byť vyššia ako 95 %), pričom by sa malo vynaložiť primerané úsilie na identifikáciu prímesí tvoriacich 2 % alebo viac. Čistota spolu s identitou a podielom všetkých prímesí, ktoré boli identifikované, sa uvedú v správe. V rámci jednotlivých regulačných programov môžu byť k dispozícii ďalšie usmernenia na uľahčenie vymedzenia a špecifikácií testovaných chemikálií zložených zo zmesí a metódy na určenie čistoty.

Výber dávky

Pilotná štúdia

20. Zvyčajne na účely pilotnej štúdie postačuje jednorazová orálna dávka. Dávka by mala byť netoxická, ale dostatočne vysoká, aby umožnila identifikáciu metabolitov v exkrétoch (a v plazme, ak je to vhodné), ako aj splnenie stanoveného účelu pilotnej štúdie, ako sa uvádza v odseku 12 tejto testovacej metódy.

Základné štúdie

21. V prípade základných štúdií sa uprednostňujú minimálne dve dávky, lebo informácie získané pomocou najmenej dvoch skupín s dávkou môžu byť užitočné pri stanovení dávky v ďalších štúdiách toxicity a pri hodnotení vzťahu dávky a reakcie v rámci testov toxicity, ktoré sú už k dispozícii.

22. Ak sa podajú dve dávky, obidve dávky by mali byť dostatočne vysoké, aby bolo možné identifikovať metabolity v exkrétoch (a v plazme, ak je to vhodné). Pri výbere dávok treba zvážiť informácie získané z dostupných údajov o toxicite. Ak takéto informácie nie sú k dispozícii (napr. zo štúdií akútnej orálnej toxicity s údajmi o klinických príznakoch toxicity alebo zo štúdií toxicity v opakovaných dávkach), možno zvážiť použitie takej hodnoty vyššej dávky, ktorá je nižšia ako odhadovaná dávka LD_{50} (orálny a dermálny spôsob podávania) alebo odhadovaná koncentrácia LC_{50} (inhalačný spôsob podávania) alebo ktorá je pod úrovňou nižšej hodnoty odhadu rozsahu akútnej toxicity. Nižšia dávka by mala byť zlomkom vyššej dávky.

23. Ak sa skúma iba jedna úroveň dávky, podľa možnosti by dávka mala byť dostatočne vysoká, aby bolo možné identifikovať metabolity v exkrétoch (a v plazme, ak je to vhodné), ale súčasne by nemala viesť k zjavnej toxicite. Nepoužitie druhej úrovne dávky je potrebné odôvodniť.

24. Ak je potrebné zistiť účinok dávky na kinetické procesy, dve dávky nemusia postačovať a aspoň jedna dávka by mala byť dostatočne vysoká na nasýtenie týchto procesov. Ak plocha pod krivkou závislosti koncentrácie a času (AUC) medzi dvoma úrovňami dávky použitými v základnej štúdii nie je lineárna, je zrejmé, že k nasýteniu jedného alebo dvoch kinetických procesov dochádza niekde medzi týmito dvomi úrovňami dávky.

▼M4

25. V prípade testovaných chemikálií s nízkou toxicitou sa použije maximálna dávka na úrovni 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti (orálny a dermálny spôsob podávania) (usmernenia pre inhalačný spôsob podávania sú k dispozícii v kapitole B.2 tejto prílohy; táto dávka zvyčajne nepresahuje 2 mg/l). V rámci úvah týkajúcich sa chemikálie môže byť v závislosti od regulačných potrieb potrebná vyššia dávka. Výber dávky treba vždy odôvodniť.

26. Na stanovenie potenciálu akumulácie a/alebo perzistencie môžu byť vhodné toxikokinetické údaje a údaje o rozdelení tkanív týkajúce sa jednorazovej dávky. Za určitých okolností však môže byť nutné podanie v opakovaných dávkach i) na účely komplexnejšieho stanovenia potenciálu akumulácie a/alebo perzistencie alebo zmien v TK (t. j. napríklad enzýmovej indukcie a inhibície) alebo ii) na základe požiadaviek príslušného regulačného systému. Hoci v štúdiách v opakovaných dávkach väčšinou postačuje opakované podanie nízkej dávky, za určitých okolností môže byť nutné aj opakované podanie vysokej dávky (pozri odsek 57).

Podávanie testovanej chemikálie

27. Testovaná chemikália sa rozpustí alebo homogénne suspenduje v rovnakom nosiči, aký bol použitý v štúdiách orálnej toxicity pri podávaní danej testovanej chemikálie cez sondu, ak sú tieto informácie o nosiči k dispozícii. Výber nosiča je potrebné odôvodniť. Výber nosiča a objemu dávkovania by sa mal zvážiť v pláne štúdie. Chemikália sa zvyčajne podáva cez sondu. Podávanie formou želatínových kapsúl alebo ako zmes krmiva však môže mať v určitých situáciách výhody (v oboch prípadoch je potrebné uviesť odôvodnenie). Treba overiť, či bola každému zvieraťu podaná skutočná dávka.

28. Maximálny objem tekutiny, ktorá sa jednorazovo podá cez orálnu sondu, závisí od veľkosti testovacích zvierat, druhu nosiča dávky a od skutočnosti, či sa pred podaním testovanej chemikálie zviera kŕmilo alebo nie. Podávanie alebo obmedzenie krmiva pred dávkovaním je potrebné odôvodniť. Objem by za bežných okolností mal byť podľa možnosti čo najnižší v prípade vodných, ako aj v prípade bezvodých nosičov. Objemy dávok by v prípade hlodavcov normálne nemal presahovať 10 ml/kg telesnej hmotnosti. Objemy nosičov použitých v prípade lipofilnejších testovaných chemikálií sa môžu začínať na úrovni 4 ml/kg telesnej hmotnosti. V prípade opakovaných dávok, keď je kontraindikovaný denný pôst, je potrebné zvážiť nižšie objemy dávok (napr. 2 – 4 ml/kg telesnej hmotnosti). Podľa možnosti by sa malo zvážiť použitie takého objemu dávky, ktorý je konzistentný s objemom použitým v iných štúdiách orálnej toxicity testovanej chemikálie pri podávaní cez sondu.

29. Intravenózne (IV) podávanie testovanej chemikálie a meranie testovanej chemikálie v krvi a/alebo v exkrétoch možno použiť na stanovenie biodostupnosti alebo relatívnej orálnej absorpcie. V prípade IV štúdie sa pomocou vhodného nosiča podá jedna dávka (zvyčajne rovnaká, ale nie vyššia ako nižšia orálna dávka – pozri výber dávky) testovanej chemikálie. Tento materiál sa vo vhodnom objeme (napr. 1 ml/kg telesnej hmotnosti) aplikuje na vybraté miesto najmenej štyrom zvieratám príslušného pohlavia (ak je to opodstatnené, možno použiť obidve pohlavia, pozri odsek 16). Pri IV podávaní testovanej chemikálie je potrebná príprava úplne rozpustenej alebo suspendovanej dávky. Nosič by pri IV podávaní nemal interferovať s integritou krvi alebo s prietokom krvi. Ak sa testovaná chemikália podáva

▼M4

infúzne, dávka podaná infúziou by sa mala uviesť v správe a medzi jednotlivými zvieratami by mala byť štandardizovaná, za predpokladu, že sa použije infúzna pumpa. Kanylovanie hrdelnej žily (na podanie testovanej chemikálie a/alebo na odber krvi) alebo podanie cez femorálnu artériu sa vykonáva v anestézii. Druh anestézie treba dôkladne zvážiť, lebo môže ovplyvniť toxikokinetiku. Zvieratám by sa pred podaním testovanej chemikálie s nosičom malo umožniť, aby sa dostatočne zotavili.

30. Iné spôsoby podávania, ako je dermálne alebo inhalačné podávanie (pozri odseky 74 – 78), možno použiť v prípade určitých testovaných chemikálií po zvážení ich fyzikálno-chemických vlastností a predpokladaného použitia a expozície u ľudí.

Merania

Hmotnostná bilancia

31. Hmotnostná bilancia sa stanoví sčítaním percenta podanej (rádioaktívnej) dávky vylúčenej v moči, výkaloch a vydychovanom vzduchu a percenta prítomného v tkanivách, zostávajúcich častiach mŕtveho tela a zvyškoch v klietke (pozri odsek 46). Vo všeobecnosti sa celková výťažnosť podanej testovanej chemikálie (rádioaktivita) v rozsahu > 90 % považuje za primeranú.

Absorpcia

32. Počiatočný odhad absorpcie možno získať odčítaním percenta dávky v gastrointestinálnom trakte a/alebo výkaloch od ukazovateľa hmotnostnej bilancie. Pre výpočet percenta absorpcie pozri odsek 33 Pre vyšetrovanie exkrétov pozri odseky 44 – 49. Ak presný rozsah absorpcie nasledujúcej po orálnom dávkovaní nie je možné určiť pomocou štúdií hmotnostnej bilancie (napr. ak je vo výkaloch prítomných viac ako 20 % podanej dávky), mohli by byť potrebné ďalšie vyšetrenia. Tieto štúdie môžu zahŕňať buď 1. orálne podávanie testovanej chemikálie a meranie testovanej chemikálie v žlči, alebo 2. orálne a IV podávanie testovanej chemikálie a meranie čistej testovanej chemikálie prítomnej v moči, vo vydychovanom vzduchu a v mŕtvom tele v prípade oboch spôsobov podávania. Pri oboch plánoch štúdie sa vykoná meranie rádioaktivity ako zástupná metóda chemicky špecifickej analýzy testovanej chemikálie a metabolitov.

33. Ak sa vykonáva štúdia exkrécie žlčou, zvyčajne sa použije orálne podávanie. V tejto štúdii sa kanylujú žlčovody najmenej štyroch zvierat príslušného pohlavia (alebo oboch pohlaví, ak je to opodstatnené) a podá sa jednorazová dávka testovanej chemikálie. Po podaní testovanej chemikálie sa sleduje exkrécia rádioaktivity/testovanej chemikálie v žlči tak dlho, ako je potrebné na odhad percenta podanej dávky, ktorá sa vylúči touto cestou. Odhad možno použiť na priamy výpočet rozsahu orálnej absorpcie takto:

$$\text{percento absorpcie} = \frac{(\text{množstvo v žlči} + \text{moči} + \text{ vydychovanom vzduchu} + \text{mŕtvom tele bez obsahu gastrointestinálneho traktu})/\text{podané množstvo} \times 100}{}$$

34. V prípade niektorých tried testovanej chemikálie môže dôjsť k priamej sekrécii absorbovanej dávky cez črevné membrány. V takých prípadoch sa meranie percentuálnej dávky vo výkaloch po orálnom podaní dávky pri potkanovi s kanylovaným žlčovodom nepovažuje za reprezentatívne percento neabsorbovanej dávky. V prípade, že sa očakáva črevná sekrécia, sa odporúča, aby bolo percento absorbovanej dávky založené na absorpcii vypočítanej na základe porovnania exkrécie pri orálnom a IV podaní (potkan s neporušeným alebo s kanylovaným žlčovodom) (pozri odsek 35). Takisto sa odporúča, aby sa v prípade, keď sa kvantifikácia črevnej sekrécie považuje za nevyhnutnú, odmerala exkrécia v kanylovanom žlčovode potkana po IV podaní dávky.

▼M4

Biodostupnosť

35. Biodostupnosť možno stanoviť z kinetiky plazmy/krvi pri skupinách s orálnym a IV podávaním, ako sa uvádza v odsekoch 50 – 52, pomocou špecifickej chemickej analýzy testovanej chemikálie a/alebo príslušného metabolitu/metabolitov. Nevyžaduje sa teda rádiooznačená testovaná chemikália. Biodostupnosť (F) testovanej chemikálie alebo príslušného metabolitu/metabolitov možno vypočítať takto:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (Dávka_{IV}/Dávka_{exp})$$

kde AUC je oblasť pod krivkou závislosti koncentrácie plazmy a času a exp je experimentálny spôsob podávania (orálny, dermálny alebo inhalačný).

36. Na účely hodnotenia rizík systémových účinkov sa vo všeobecnosti pri porovnávaní systémových koncentrácií zo štúdií zvierat s analogickými biomonitorovacími údajmi zo štúdií expozície pracovníkov uprednostňuje biodostupnosť toxickej zložky pred percentom absorpcie. Situácia môže byť ešte zložitejšia, ak sú dávky v nelineárnom rozsahu, preto je dôležité, aby sa v rámci toxikokinetického skríningu stanovili dávky v lineárnom rozsahu.

Distribúcia v tkanivách

37. Poznatky o distribúcii testovanej chemikálie a/alebo jej metabolitov v tkanivách sú dôležité na identifikáciu cieľových tkanív a na pochopenie hlavných mechanizmov toxicity, ako aj na získanie informácií o potenciáli akumulácie a perzistencie testovanej chemikálie a metabolitov. Percento celkovej (rádioaktívnej) dávky v tkanivách, ako aj vo zvyšných častiach mŕtveho tela by sa malo odmerať aspoň na konci pokusu s exkréciou (napr. zvyčajne do siedmich dní po dávke alebo skôr, v závislosti od špecifického správania testovanej chemikálie). Ak sa na konci štúdie v tkanivách nezistí testovaná chemikália (napr. z dôvodu, že testovaná chemikália mohla byť eliminovaná pred ukončením štúdie pre krátky polčas), treba dať pozor, aby sa predišlo nesprávnej interpretácii údajov. V takejto situácii treba vyšetriť distribúciu v tkanivách v čase, keď má testovaná chemikália (a/alebo metabolit) najvyššiu koncentráciu v plazme/krvi (T_{max}) alebo v čase najvyššej močovej exkrécie (pozri odsek 38). Okrem toho môže byť potrebný odber tkanív v iných časoch s cieľom určiť distribúciu testovanej chemikálie a/alebo jej metabolitov v tkanivách na účely posúdenia závislosti od času (ak je to vhodné), pomôcť pri stanovení hmotnostnej bilancie a/alebo vyhovieť požiadavkám príslušného orgánu. Medzi tkanivá, ktoré treba odobrať, patrí pečeň, tuk, gastrointestinálny trakt, obličky, slezina, celá krv, zvyšné časti mŕtveho tela, tkanivá cieľových orgánov a všetky ostatné tkanivá (napr. štítna žľaza, erytrocyty, rozmnožovacie orgány, koža, oči – najmä pri zvieratách s pigmentáciou), ktoré majú potenciálny význam pre toxikologické hodnotenie testovanej chemikálie. Pre maximalizáciu využiteľnosti zvierat a v prípade, že je v štúdiách subchronickej alebo chronickej toxicity pozorovaná toxicita cieľového orgánu, by sa mala zvážiť analýza ďalších tkanív v tých istých časoch. Do správy sa uvedie aj koncentrácia (rádioaktívnych) rezíduí a pomer tkaniva a plazmy (krvi).

38. Hodnotenie distribúcie v tkanivách v ďalších časoch, ako je čas najvyššej koncentrácie v plazme/krvi (napr. T_{max}) alebo čas najvyššej močovej exkrécie, získané pomocou príslušných pokusov týkajúcich sa kinetiky plazmy/krvi alebo exkrécie môže byť takisto potrebné alebo ho môže požadovať príslušný orgán. Tieto informácie môžu byť užitočné na pochopenie toxicity a potenciálu akumulácie a perzistencie testovanej chemikálie a jej metabolitov. Je potrebné uviesť odôvodnenie výberu vzoriek. Vzorky na analýzu by vo všeobecnosti mali byť rovnaké ako vzorky uvedené vyššie (pozri odsek 37).

▼M4

39. Rádioaktivitu možno v štúdiách distribúcie v tkanivách kvantifikovať pomocou disekcie orgánov, homogenizácie, horenia a/alebo rozpustenia a následnej kvapalinovej scintilačnej spektroskopie (LSC) zachytených rezíduí. Určité metódy, ktoré sú v súčasnosti v rôznych štádiách vývoja, napr. kvantitatívna autorádiografia celého tela a receptorová mikroskopická autorádiografia, môžu preukázať užitočnosť pri zisťovaní distribúcie testovanej chemikálie v orgánoch a/alebo v tkanivách (3) (4).

40. V prípade iného ako orálneho spôsobu expozície sa odoberú a analyzujú konkrétne tkanivá, ako sú pľúca v prípade inhalačných štúdií alebo koža v prípade dermálnych štúdií. Pozri odseky 74 – 78.

Metabolizmus

41. Exkréty (a plazma, ak je to vhodné) sa odoberú na účely identifikácie a kvantifikácie nezmenenej testovanej chemikálie a metabolitov, ako sa uvádza v odsekoch 44 – 49. Zhromažďovanie exkrétov s cieľom uľahčiť identifikáciu metabolitov v rámci danej skupiny s dávkou je prípustné. Pri každom čase odberu sa odporúča profilovanie metabolitov. Ak tomu však bráni nedostatok vzoriek a/alebo rádioaktivity, je prípustný odber moču a výkalov v rôznych časoch. Odber od rôznych pohlaví alebo zvierat s rôznymi dávkami však prípustný nie je. Na vyšetrenie moču, výkalov, vydychovanej rádioaktivity zo zvierat, ktorým bola podaná dávka, a, ak je to vhodné, žlče by sa mali použiť vhodné kvalitatívne a kvantitatívne metódy.

42. Je potrebné vynaložiť primerané úsilie na identifikáciu všetkých metabolitov, ktoré predstavujú 5 % alebo viac podanej dávky, a zistiť metabolickú schému testovanej chemikálie. Je nutné identifikovať testované chemikálie, ktoré v exkrétoch predstavujú 5 % alebo viac podanej dávky. Identifikácia znamená presné štrukturálne určenie zložiek. Identifikácia sa najčastejšie vykonáva buď súbežnou chromatografiou metabolitu s využitím známych štandardov pomocou dvoch rôznych systémov, alebo metódami, pri ktorých možno zabezpečiť pozitívnu identifikáciu štruktúry, ako je hmotnostná spektrometria, jadrová magnetická rezonancia (NMR) atď. V prípade súbežnej chromatografie sa chromatografické metódy využívajúce rovnakú stacionárnu fázu pri dvoch rôznych systémoch rozpúšťania nepovažujú za vhodnú dvojmetódovú verifikáciu identity metabolitu, lebo tieto metódy nie sú nezávislé. Identifikácia pomocou súbežnej chromatografie by sa mala vykonať pomocou dvoch odlišných, analyticky nezávislých systémov, ako je chromatografia na tenkej vrstve (TLC) s reverznou a normálnou fázou a vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC). Za predpokladu, že chromatografická separácia má dostatočnú kvalitu, nie je potrebné ďalšie overenie spektroskopickými prostriedkami. Jednoznačnú identifikáciu možno prípadne zabezpečiť aj pomocou metód, ktoré poskytujú informácie o štruktúre, ako sú: kvapalinová chromatografia – hmotnostná spektrometria (LC-MS) alebo kvapalinová chromatografia – tandemová hmotnostná spektrometria (LC-MS/MS), plynová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou (GC-MS) a spektrometria NMR.

43. Ak identifikácia metabolitov predstavujúcich 5 % alebo viac podanej dávky nie je možná, v záverečnej správe treba uviesť odôvodnenie/vysvetlenie. Môže byť vhodné identifikovať metabolity predstavujúce menej ako 5 % podanej dávky s cieľom lepšie pochopiť metabolickú premenu na účely hodnotenia nebezpečnosti a/alebo rizík testovanej chemikálie. Ak je to možné, vždy treba uviesť potvrdenie štruktúry. To môže zahŕňať profilovanie v plazme, krvi alebo v iných tkanivách.

▼M4

Exkrécia

44. Miera a rozsah exkrécie podanej dávky by sa mala stanoviť na základe merania percenta (rádioaktívnej) dávky získanej z moču, výkalov a vydychovaného vzduchu. Tieto údaje budú užitočné aj pri stanovovaní hmotnostnej bilancie. Množstvá testovanej chemikálie (rádioaktivity) odstránenej prostredníctvom moču, výkalov a vydychovaného vzduchu sa stanovia v príslušných časových intervaloch (pozri odseky 47 – 49). Pokusy v opakovaných dávkach by mali byť vhodne naplánované, aby bolo možné zozbierať údaje o exkrécii a splniť ciele opísané v odseku 26. To umožní porovnanie s pokusmi v jednorazových dávkach.

45. Ak pilotná štúdia preukáže, že nedošlo k exkrécii významného množstva testovanej chemikálie (rádioaktivity) (podľa odseku 49) vo vydychovanom vzduchu, potom v konečnej štúdii nie je potrebný odber vydychovaného vzduchu.

46. Každé zviera sa umiestni do samostatnej metabolickej jednotky na odber exkrétov (moču, výkalov a vydychovaného vzduchu). Na konci každého obdobia odberu (pozri odseky 47 – 49) sa metabolické jednotky vyčistia vhodným rozpúšťadlom (tento krok sa nazýva „čistenie klietky“), aby sa zabezpečila maximálna výťažnosť testovanej chemikálie (rádioaktivity). Odber exkrétov sa ukončí po siedmich dňoch alebo po tom, ako sa zozbiera aspoň 90 % podanej dávky, podľa toho, čo nastane skôr.

47. Celkové množstvá testovanej chemikálie (rádioaktivity) v moči sa stanovia najmenej v dvoch časoch v prvý deň odberu, pričom jedno stanovenie by sa malo vykonať 24 hodín po dávkovaní, a následne každý deň až do konca štúdie. V prvý deň sa odporúča zvoliť si viac ako dva časy odberu (napr. po 6, 12 a 24 hodinách). V rámci výsledkov pilotných štúdií sa analyzujú informácie o alternatívnych alebo ďalších časoch odberu. Plán odberov je potrebné odôvodniť.

48. Celkové množstvá testovanej chemikálie (rádioaktivity) vo výkaloch sa stanovia na dennej báze, pričom prvý odber sa vykoná 24 hodín po dávkovaní a odbery budú pokračovať až do konca štúdie, pokiaľ z pilotných štúdií nevyplýva, že by bolo vhodnejšie použiť alternatívne alebo ďalšie časy odberov. Plánovanie alternatívnych plánov odberu je potrebné odôvodniť.

49. Odber vydychovaného CO_2 a iných prchavých materiálov možno v rámci pokusu danej štúdie prerušiť v prípade, že sa počas 24-hodinového obdobia odberu vo vydychovanom vzduchu zistí menej ako 1 % podanej dávky.

Štúdie časového priebehu

Kinetika plazmy/krvi

50. Účelom týchto štúdií je získať odhady základných TK parametrov [napr. C_{max}, T_{max}, polčas ($t_{1/2}$), AUC] testovanej chemikálie. Tieto štúdie sa môžu vykonávať s využitím jednej dávky alebo častejšie s využitím dvoch alebo viacerých dávok. Dávky sa stanovia na základe charakteru pokusu a/alebo otázky, ktorá sa skúma. Kinetické údaje môžu byť potrebné na riešenie otázok, ako je biodostupnosť testovanej chemikálie, a/alebo na objasnenie účinku dávky na klírens (napr. na objasnenie, či dôjde k nasýteniu klírensu v závislosti od dávky).

51. Pre tieto štúdie sa v každej skupine s dávkou použijú najmenej štyri zvieratá z jedného pohlavia. Výber pohlavia použitých zvierat je potrebné odôvodniť. Použitie oboch pohlaví (štyri samce a štyri samice) sa zváži, ak existujú dôkazy svedčiace o významných rozdieloch v toxicite, ktoré súvisia s pohlavím.

▼M4

52. Po podaní (rádiooznačenej) testovanej chemikálie sa pomocou vhodnej metodiky odberu v primeraných časoch z každého zvieraťa odoberú vzorky krvi. Objem a počet vzoriek krvi, ktoré možno odobrať z každého zvieraťa, môže byť obmedzený potenciálnymi účinkami opakovaných odberov na zdravie/fyziológiu zvierat a/alebo citlivosťou analytickej metódy. Vzorky sa analyzujú v prípade každého zvieraťa. Za určitých okolností (napr. pri charakterizácii metabolitov) môže byť nutné odobrať vzorky z viac ako jedného zvieraťa. Odobraté vzorky sa jasne identifikujú, pričom sa uvedie odôvodnenie odberu. Ak sa použije rádiooznačená testovaná chemikália, môže byť vhodné uviesť analýzu celkovej prítomnej rádioaktivity. V takom prípade sa celková rádioaktivita analyzuje v celej krvi a v plazme alebo v plazme a v červených krvinkách, čo umožní výpočet pomeru krvi a plazmy. Za iných okolností môžu byť potrebné konkrétnejšie vyšetrenia, ktoré si vyžadujú identifikáciu materskej zlúčeniny a/alebo metabolitov, alebo vyšetrenia na účely hodnotenia bielkovinových väzieb.

Kinetika ostatných tkanív

53. Účelom týchto štúdií je získať informácie o časovom priebehu na objasnenie otázok súvisiacich s problémami, ako sú druh toxického pôsobenia, bioakumulácia a bioperzistencia, a to prostredníctvom stanovenia úrovne testovanej chemikálie v jednotlivých tkanivách. Výber tkanív a počet hodnotených časových bodov bude závisieť od skúmaného problému a toxikologickej databázy testovanej chemikálie. Pri plánovaní týchto dodatočných štúdií kinetiky tkanív treba zohľadniť zozbierané informácie, ako sa uvádza v odsekoch 37 – 40. Tieto štúdie sa môžu vykonávať s využitím jednorazovej dávky alebo opakovaných dávok. Použitý prístup je potrebné podrobne odôvodniť.

54. Dôvody na vykonanie ďalších kinetických štúdií tkanív môžu zahŕňať:

— dôkazy o predĺženom polčase krvi, ktoré svedčia o možnej akumulácii testovanej chemikálie v jednotlivých tkanivách, alebo

— záujem zistiť, či sa dosiahla stabilná úroveň v konkrétnych tkanivách (napr. v štúdiách v opakovaných dávkach aj v prípade, že sa zdanlivo dosiahla stabilná úroveň testovanej chemikálie v krvi, môže byť záujem uistiť sa, či sa stabilná úroveň dosiahla aj v cieľových orgánoch).

55. Pri týchto druhoch štúdií časového priebehu sa orálne podá vhodná dávka testovanej chemikálie najmenej štyrom zvieratám v každej skupine s dávkou v každom časovom bode, pričom sa monitoruje časový priebeh distribúcie vo vybratých tkanivách. Ak nie je pozorovaná toxicita príznačná pre niektoré pohlavie, možno použiť iba jedno pohlavie. To, či sa bude analyzovať celková rádioaktivita alebo materská chemikália a/alebo metabolity, bude takisto závisieť od skúmaného problému. Hodnotenie distribúcie v tkanivách by sa malo vykonať s využitím primeraných metód.

Enzýmová indukcia/inhibícia

56. Štúdie skúmajúce možné účinky enzýmovej indukcie/inhibície alebo biotransformáciu skúmanej testovanej chemikálie môžu byť potrebné v jednom alebo vo viacerých z uvedených prípadov:

1. dostupné dôkazy indikujú vzťah medzi biotransformáciou testovanej chemikálie a zvýšenou toxicitou;

2. dostupné údaje o toxicite indikujú nelineárny vzťah medzi dávkou a metabolizmom;

▼M4

3. výsledky štúdií identifikácie metabolitov ukazujú identifikáciu potenciálne toxických metabolitov, ktoré mohli vzniknúť enzýmovým pôsobením indukovaným testovanou chemikáliou;

4. pri vysvetľovaní účinkov, pri ktorých sa predpokladá súvislosť s enzýmovou indukciou;

5. ak sa pozorujú toxikologicky významné zmeny v metabolickom profile testovanej chemikálie na základe pokusov *in vitro* alebo *in vivo* s využitím rôznych druhov zvierat alebo podmienok, môže byť potrebná charakterizácia pôsobiaceho enzýmu (enzýmov) (napr. enzýmov fázy I, ako sú izoenzýmy cytochróm P450 monooxygenázového systému, enzýmy fázy II, ako sú izoenzýmy sulfotransferázy alebo uridín-difosfát-glukuronosyltransferázy, alebo akýchkoľvek iných relevantných enzýmov). Tieto informácie možno použiť pri hodnotení vhodnosti živočíšnych druhov pre extrapoláciu druhov.

57. Na hodnotenie testovanej chemikálie v súvislosti so zmenami v TK sa použijú vhodné protokoly k štúdii, ktoré sú náležite overené a odôvodnené. Príklady plánov štúdií pozostávajú z opakovaného dávkovania neoznačenej testovanej chemikálie, po ktorom nasleduje jednorazová rádiooznačená dávka v deň 14 alebo opakované dávkovanie rádiooznačenej testovanej chemikálie a odber vzoriek v dňoch 1, 7 a 14 na stanovenie profilov metabolitov. Pomocou opakovaného dávkovania rádiooznačenej testovanej chemikálie možno získať aj informácie o bioakumulácii (pozri odsek 26).

DOPLŇUJÚCE PRÍSTUPY

58. Doplňujúce prístupy presahujúce rámec pokusov *in vivo* opísaných v tejto testovacej metóde môžu priniesť užitočné informácie o absorpcii, distribúcii, metabolizme alebo eliminácii testovanej chemikálie pri určitých živočíšnych druhoch.

Použitie informácií *in vitro*

59. Pomocou vhodných testovacích systémov možno v štúdiách *in vitro* objasniť viaceré otázky týkajúce sa metabolizmu testovanej chemikálie. Čerstvo izolované alebo kultivované hepatocyty a subcelulárne frakcie (napr. mikrozómy a cytosól alebo frakcia S9) z pečene možno použiť na štúdium možných metabolitov. Pre hodnotenie rizík môže byť zaujímavý lokálny metabolizmus v cieľovom orgáne, napr. v pľúcach. Na tieto účely môžu byť užitočné mikrozómové frakcie cieľových tkanív. Štúdie s mikrozómami môžu byť prínosné pri riešení potenciálnych rozdielov medzi pohlaviami a životnými fázami a pri charakterizácii enzýmových parametrov (K_m a V_{max}), ktoré môžu pomôcť pri hodnotení závislosti metabolizmu od dávky v súvislosti s úrovňami expozície. Okrem toho môžu byť mikrozómy užitočné pri identifikácii špecifických mikrozómových enzýmov podieľajúcich sa na metabolizme testovanej chemikálie, ktoré môžu mať význam pri extrapolácii živočíšnych druhov (pozri aj odsek 56). Takisto potenciál indukcie biotransformácie možno preskúmať pomocou pečeňových subcelulárnych frakcií (napr. mikrozómov a cytosólu) zvierat, ktoré boli skúmanej testovanej chemikálii vystavené skôr, *in vitro* prostredníctvom štúdií hepatocytovej indukcie alebo zo špecifických bunkových línií vyjadrujúcich relevantné enzýmy. Za určitých okolností a v primeraných podmienkach možno pri určovaní potenciálnych rozdielov v biotransformácii medzi živočíšnymi druhmi zvážiť použitie subcelulárnych frakcií pochádzajúcich z ľudských tkanív. Výsledky z vyšetrení *in vitro* môžu byť užitočné aj pri vývoji modelov PBTK (5).

▼M4

60. Štúdie dermálnej absorpcie *in vitro* môžu priniesť doplňujúce informácie na účely charakterizácie absorpcie (6).

61. Primárne bunkové kultúry z pečeňových buniek a čerstvé plátky tkanív možno použiť na zodpovedanie podobných otázok ako v prípade pečeňových mikrozómov. V určitých prípadoch je možné zodpovedať konkrétne otázky pomocou bunkových línií s vymedzeným vyjadrením relevantného enzýmu alebo pomocou kultivovaných bunkových línií. V určitých prípadoch môže byť užitočné študovať inhibíciu a indukciu špecifických cytochróm P450 izozýmov (napr. CYP1A1, 2E1, 1A2 a iných) a/alebo enzýmov fázy II materskej zlúčeniny s využitím štúdií *in vitro*. Získané informácie môžu mať význam v prípade zlúčenín s podobnou štruktúrou.

Použitie toxikokinetických údajov zo štúdií toxicity ako doplňujúcich informácií

62. Analýza vzoriek krvi, tkanív a/alebo exkrétov odobratých v priebehu akýchkoľvek iných štúdií toxicity môže priniesť údaje o biodostupnosti, zmenách koncentrácií v plazme v závislosti od času (AUC, C_{max}), potenciáli bioakumulácie, klírense a zmenách súvisiacich s pohlavím alebo polčasom v metabolizme a kinetike.

63. Úvahy o pláne štúdie možno použiť na zodpovedanie otázok týkajúcich sa: nasýtenia absorpcie, ciest biotransformácie alebo exkrécie pri vyšších úrovniach dávky, pôsobenia nových metabolických ciest pri vyšších dávkach a obmedzenia toxických metabolitov na vyššie dávky.

64. Ostatné úvahy v rámci hodnotenia nebezpečnosti môžu zahŕňať otázky, ako napríklad:

— citlivosť súvisiaca s vekom v dôsledku rozdielov stavu hematoencefalickej bariéry, obličiek a/alebo detoxifikačných schopností,

— citlivosť subpopulácie v dôsledku rozdielov medzi schopnosťami biotransformácie alebo iných TK rozdielov,

— rozsah expozície plodu v dôsledku transplacentárneho prenosu chemikálií alebo expozície novorodenca prostredníctvom laktácie.

Použitie toxikokinetického modelovania

65. Toxikokinetické modely môžu byť užitočné pri rôznych aspektoch hodnotenia nebezpečnosti a rizík, ako napríklad pri predpovedaní systémovej expozície a dávky vo vnútorných tkanivách. Okrem toho sa môžu vyšetrovať konkrétne otázky týkajúce sa druhu pôsobenia, pričom tieto modely môžu predstavovať základ pre extrapoláciu živočíšnych druhov, spôsoby expozície, štruktúry dávkovania a hodnotenie rizík pre človeka. Údaje užitočné pre vývoj PBTK modelov pre testovanú chemikáliu pri akomkoľvek živočíšnom druhu zahŕňajú 1. rozdeľovacie koeficienty; 2. biochemické konštanty a fyziologické parametre; 3. absorpčné parametre pre konkrétne cesty a 4. kinetické údaje *in vivo* pre hodnotenie modelov [napr. parametre klírensu pre relevantné (> 10 %) vylučovacie cesty, K_m a V_{max} pre metabolizmus]. Experimentálne údaje použité pri vývoji modelov by sa mali získať metódami, ktoré sú z vedeckého hľadiska primerané, pričom výsledky modelov treba overiť. Na uľahčenie vývoja nekompartmentových fyziologicky založených modelov sa často stanovujú parametre špecifické pre testovanú chemikáliu a živočíšny druh, ako je miera absorpcie, rozdeľovacia konštanta krv – tkanivo a konštanta miery metabolizmu (7).

▼M4

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

66. Odporúča sa, aby správa o štúdii zahŕňala obsah.

Hlavná časť správy

67. Hlavná časť správy zahŕňa informácie získané pomocou tejto testovacej metódy, ktoré sú rozdelené do oddielov a odsekov takto:

Zhrnutie

68. Tento oddiel správy o štúdii obsahuje zhrnutie plánu štúdie a opis použitých metód. Takisto by mal poukazovať na hlavné zistenia týkajúce sa hmotnostnej bilancie, charakteru a veľkosti metabolitov, zvyškov tkanív, klírensu, potenciálu bioakumulácie, rozdielov medzi pohlaviami atď. Zhrnutie by malo byť dostatočne podrobné, aby umožnilo hodnotenie zistení.

Úvod

69. Tento oddiel správy obsahuje ciele, odôvodnenie a plán štúdie, ako aj príslušné odkazy a akékoľvek informácie o skutočnostiach, ktoré štúdii predchádzali.

Materiály a metódy

70. Tento oddiel správy obsahuje podrobné opisy všetkých súvisiacich informácií vrátane týchto údajov:

a) Testovaná chemikália

Tento pododdiel zahŕňa identifikáciu testovanej chemikálie: chemický názov, molekulárnu štruktúru, kvalitatívne a kvantitatívne stanovenie jej chemického zloženia, chemickú čistotu a, ak je to možné, druh a množstvá všetkých prímesí. Takisto zahŕňa informácie o fyzikálno-chemických vlastnostiach vrátane fyzikálneho skupenstva, farby, makroskopickej rozpustnosti a/alebo rozdeľovacieho koeficientu, stability a, ak je to vhodné, žieravosti. Podľa potreby sa uvedú informácie o izoméroch. Ak je testovaná chemikália rádiooznačená, tento pododdiel bude obsahovať tieto informácie: druh rádionuklidu, umiestnenie značky, špecifická aktivita a rádiochemická čistota.

Uvedie sa druh alebo opis všetkých nosičov, riedidiel, suspenzných látok a emulzifikátorov alebo iných materiálov použitých pri podávaní testovanej chemikálie.

b) Pokusné zvieratá

Tento pododdiel obsahuje informácie o pokusných zvieratách vrátane výberu živočíšneho druhu a odôvodnenia, kmeňa a veku na začiatku štúdie, pohlavia, ako aj telesnej hmotnosti, zdravotného stavu a chovu zvierat.

c) Metódy

Tento pododdiel obsahuje informácie o pláne štúdie a použitej metodike. Zahŕňa tieto údaje:

1. odôvodnenie akýchkoľvek zmien spôsobu expozície a podmienok expozície, ak je to vhodné;

▼M4

2. odôvodnenie výberu úrovní dávok;

3. opis pilotných štúdií použitých v experimentálnom pláne následných štúdií, ak je to vhodné, pričom sa predložia doplňujúce údaje o pilotných štúdiách;

4. postup prípravy dávkovacieho roztoku a druh rozpúšťadla alebo nosiča, ak sa použil;

5. počet skupín, ktorým sa aplikovala chemikália, a počet zvierat v skupine;

6. úrovne a objem dávkovania (a špecifická aktivita dávky, ak sa použila rádioaktivita);

7. spôsob (spôsoby) a metódy podávania;

8. frekvencia dávkovania;

9. obdobie pôstu (ak sa použilo);

10. celková rádioaktivita na jedno zviera;

11. zaobchádzanie so zvieratami;

12. odber vzoriek a manipulácia s nimi;

13. analytické metódy použité na separáciu, kvantifikáciu a identifikáciu metabolitov;

14. detekčný limit pre použité metódy;

15. iné pokusné merania a postupy, ktoré sa použili (vrátane overenia metód analýzy metabolitov).

d) Štatistická analýza

Ak sa na analyzovanie zistení štúdie použije štatistická analýza, je potrebné uviesť dostatočné informácie o použitej metóde analýzy a o počítačovom programe, aby mohol analýzu opätovne vyhodnotiť a zrekonštruovať nezávislý kontrolór/štatistik.

V prípade štúdií modelovania systémov, ako je PBTK, by prezentácia modelov mala zahŕňať kompletný opis modelu, ktorý umožní nezávislú rekonštrukciu a overenie modelu (pozri odsek 65 a dodatok: Vymedzenie pojmov).

Výsledky

71. Všetky údaje sa zhrnú do tabuliek s príslušným štatistickým hodnotením a opíšu sa v texte v rámci tohto oddielu. Výpočtové údaje o rádioaktivite sa zhrnú a uvedú v závislosti od štúdie, zvyčajne ako mikrogramové alebo miligramové ekvivalenty na hmotnosť vzorky, hoci je možné použiť aj iné jednotky. Tento oddiel zahŕňa grafické znázornenia zistení, reprodukciu reprezentatívnych chromatografických a spektrometrických údajov, identifikáciu/kvantifikáciu metabolitov a navrhované metabolické cesty vrátane molekulárnej štruktúry metabolitov. Okrem toho sa v tomto oddiele podľa možnosti uvedú tieto informácie:

1. Množstvo a percentuálna výťažnosť rádioaktivity v moči, výkaloch, vydychovanom vzduchu a v moči a výkaloch zo zvyškov v klietke:

— v prípade dermálnych štúdií sa uvedú aj údaje o výťažnosti testovanej chemikálie z kože po aplikácii chemikálie, z omytia kože a údaje o reziduálnej rádioaktivite v krycom obväze kože a metabolickej jednotke, ako aj výsledky štúdie dermálneho omytia. Ďalšie informácie sú uvedené v odsekoch 74 – 77,

▼M4

— v prípade inhalačných štúdií sa uvedú aj údaje o výťažnosti testovanej chemikálie z pľúc a nosových tkanív (8). Ďalšie informácie sú uvedené v odseku 78;

2. distribúcia v tkanivách uvádzaná ako percento podanej dávky a koncentrácia (mikrogramové ekvivalenty na gram tkaniva) a pomery tkanivo – krv alebo tkanivo – plazma;

3. materiálová bilancia získaná z každej štúdie vrátane vyšetrenia telesných tkanív a exkrétov;

4. koncentrácie plazmy a toxikokinetické parametre (biodostupnosť, AUC, Cmax, Tmax, klírens, polčas) po podaní príslušným spôsobom (spôsobmi) expozície;

5. rýchlosť a rozsah absorpcie testovanej chemikálie po podaní príslušným spôsobom (spôsobmi) expozície;

6. množstvá testovanej chemikálie a metabolitov (uvádzané ako percento podanej dávky) získané z exkrétov;

7. odkaz na dodatky, ktoré obsahujú údaje o všetkých meraných parametroch pri jednotlivých zvieratách (napr. podávanie dávok, percentuálna výťažnosť, koncentrácie, TK parametre atď.);

8. obrázok s navrhovanými metabolickými cestami a molekulárnou štruktúrou metabolitov.

Rozbor a závery

72. V tomto oddiele autor/autori:

1. uvedie/uvedú navrhovanú metabolickú cestu na základe výsledkov metabolizmu a charakteru testovanej chemikálie;

2. analyzuje/analyzujú všetky potenciálne živočíšne druhy a rozdiely medzi pohlaviami týkajúce sa charakteru a/alebo biotransformácie testovanej chemikálie;

3. uvedie/uvedú v tabuľkách a zanalyzuje/zanalyzujú identifikáciu a veľkosť metabolitov, klírens, potenciál bioakumulácie a úroveň tkanivových rezíduí materskej chemikálie a/alebo metabolitu (metabolitov), ako aj možné zmeny v TK parametroch súvisiace s dávkou;

4. začlení/začlenia do tohto oddielu všetky relevantné TK údaje získané v priebehu štúdií toxicity;

5. uvedie/uvedú stručný záver, ktorý možno podložiť zisteniami štúdie;

6. vloží/vložia oddiely (podľa potreby).

73. Na uvedenie podkladových bibliografických informácií, tabuliek, obrázkov, dodatkov atď. možno použiť ďalšie oddiely.

▼M4

ALTERNATÍVNE SPÔSOBY EXPOZÍCIE

Dermálna

Dermálna aplikácia

74. V tomto oddiele sa uvádzajú špecifické informácie o vyšetrení toxikokinetiky testovanej chemikálie pri dermálnom spôsobe podávania. V prípade dermálnej absorpcie je potrebné si preštudovať kapitolu B.44 tejto prílohy [Absorpcia kožou: metóda *in vivo* (9)]. Na ostatné parametre, ako je distribúcia a metabolizmus, možno použiť túto testovaciu metódu B.36. V prípade dermálnej aplikácie sa použije jedna alebo viac úrovní dávok testovanej chemikálie. Testovaná chemikália (napríklad čistý, zriedený alebo vytvorený materiál obsahujúci testovanú chemikáliu, ktorá sa aplikuje na kožu) by mala byť rovnaká (prípadne realisticky zástupná) ako chemikália, ktorej môže byť vystavený človek alebo iný potenciálny cieľový živočíšny druh. Úroveň/úrovne dávky sa vyberie/vyberú podľa odsekov 20 – 26 tejto testovacej metódy. Medzi faktory, ktoré možno vziať pri výbere dermálnej dávky do úvahy, patrí predpokladaná expozícia človeka a/alebo dávky, pri ktorých bola v iných štúdiách toxicity pozorovaná toxicita. Dermálna/dermálne dávka/dávky sa podľa potreby rozpustí/rozpustia vo vhodnom nosiči a aplikujú v objeme primeranom na podávanie dávok. Krátko pred začatím testu sa pokusným zvieratám ostrihá srsť na chrbte. Vyholenie srsti je takisto prípustné, malo by sa však uskutočniť asi 24 hodín pred testom. Pri strihaní alebo holení treba brať ohľad na to, aby sa nepoškodila koža zvierat, lebo by to viedlo k zmene priepustnosti. Na účely aplikácie testovanej chemikálie sa približne 10 % povrchu tela zbaví srsti. V prípade vysokotoxických chemikálií môže povrchová plocha predstavovať menej ako približne 10 %, ale čo najväčšia časť tejto plochy sa pokryje tenkým a rovnomerným filmom. Vo všetkých skupinách dermálneho testovania sa na aplikáciu použije tá istá povrchová plocha. Plochy, na ktoré bola chemikália aplikovaná, sa prikryjú vhodným krycím obväzom, ktorý sa upevní na dané miesto. Zvieratá sa umiestnia samostatne.

75. Na posúdenie množstva aplikovanej dávky testovanej chemikálie, ktorú možno z kože odstrániť omytím ošetrenej plochy kože šetrným mydlom a vodou, by sa mala vykonať štúdia dermálneho omytia. Táto štúdia môže byť užitočná aj pri stanovovaní hmotnostnej bilancie v prípade, že sa testovaná chemikálie podáva cez kožu. V tejto štúdii dermálneho omytia sa dvom zvieratám jednorazovo aplikuje dávka testovanej chemikálie. Úroveň dávky sa vyberie podľa odseku 23 tejto testovacej metódy (pre rozbor času kontaktu s kožou pozri aj odsek 76). Množstvá testovanej chemikálie získané z omytia sa stanovia s cieľom posúdiť efektívnosť eliminácie testovanej chemikálie prostredníctvom omytia.

76. Pokiaľ tomu nebráni žieravosť, testovaná chemikália sa aplikuje a nechá pôsobiť na koži minimálne šesť hodín. V čase odstránenia krycieho obväzu sa ošetrená plocha umyje podľa postupu uvedeného v štúdii dermálneho omytia (pozri odsek 75). Krycí obväz aj zmytý materiál sa analyzujú s cieľom zistiť, či neobsahujú zvyšky testovanej chemikálie. Na konci štúdií sa každé zviera humánne utratí podľa bodu (2) a ošetrená koža sa odstráni. Na určenie rezíduí testovanej chemikálie (rádioaktivity) sa analyzuje vhodný rez ošetrenej kože.

77. Na účely toxikokinetického hodnotenia liekov môžu byť potrebné odlišné postupy, ktoré sú v súlade s príslušným regulačným systémom.

▼M4

Inhalačná

78. Použije sa jedna koncentrácia (alebo podľa potreby viac koncentrácií) testovanej chemikálie. Koncentrácia/koncentrácie sa vyberie/vyberú podľa odsekov 20 – 26 tejto testovacej metódy. Inhalačná aplikácia sa vykoná pomocou nosového kónu alebo zariadenia na oblasť hlavy, aby sa predišlo absorpcii inými expozičnými cestami (8). Ak sa pri inhalačnej expozícii použijú iné podmienky, je potrebné v dokumentácii uviesť odôvodnenie tejto zmeny. Je potrebné vymedziť trvanie expozície inhaláciou. Expozícia zvyčajne trvá štyri až šesť hodín.

LITERATÚRA

1. OECD (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paríž.

2. OECD (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paríž.

3. Solon, E. G., Kraus, L. (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, J Pharm and Tox Methods 46: 73 – 81.

4. Stumpf, W. E. (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. J. Pharmacological and Toxicological Methods 51: 25 – 40.

5. Loizou, G., Spendiff, M., Barton, H. A., Bessems, J., Bois, F. Y., d'Yvoire, M. B., Buist, H., Clewell, H. J. 3rd, Meek, B., Gundert-Remy, U., Goerlitz, G., Schmitt, W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. Regulatory Toxicology and Pharmacology 50: 400 – 411.

6. Kapitola B.45 tejto prílohy, Absorpcia kožou: metóda in vitro.

7. IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-BasedPharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Ženeva, Svetová zdravotnícka organizácia, Medzinárodný program chemickej bezpečnosti.

8. OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paríž.

9. Kapitola B.44 tejto prílohy, Absorpcia kožou: metóda in vivo.

10. Barton, H. A. a kol. (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, Critical Reviews in Toxicology 36: 9 – 35.

11. Gibaldi, M., a Perrier, D., (1982), Pharmacokinetics, druhé vydanie, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼M4

Dodatok

VYMEDZENIE POJMOV

Absorpcia: proces (procesy) vstrebávania chemikálií do tkanív alebo cez tkanivá. Absorpcia sa vzťahuje na materskú zlúčeninu a všetky jej metabolity. Nesmie sa zamieňať s „biodostupnosťou“.

Akumulácia (bioakumulácia): priebežné zvyšovanie množstva testovanej chemikálie v tkanivách (zvyčajne v tukových tkanivách po opakovanej expozícii). Ak je príjem testovanej chemikálie do tela vyšší ako rýchlosť, ktorou sa chemikália odstraňuje, organizmus testovanú chemikáliu hromadí a môže dôjsť k vzniku toxických koncentrácií testovanej chemikálie.

ADME: skratka pre „absorpciu, distribúciu, metabolizmus a exkréciu“.

AUC: (plocha pod krivkou závislosti koncentrácie v plazme a času): plocha pod krivkou v znázornení koncentrácie testovanej chemikálie v plazme za čas. Predstavuje celkové množstvo testovanej chemikálie, ktorú telo absorbovalo počas vopred stanoveného obdobia. V lineárnych podmienkach je krivka AUC (od nulového času po nekonečno) priamo úmerná celkovému množstvu testovanej chemikálie absorbovanej telom bez ohľadu na mieru absorpcie.

Autorádiografia: (autorádiografia celého tela): používa sa na kvalitatívnu a/alebo kvantitatívnu lokalizáciu rádioaktívnej testovanej chemikálie v tkanivách. Táto metóda využíva röntgenový film alebo najnovšie digitálny phosphorimaging (fosforové zobrazovanie) na vizualizáciu rádioaktívne značených molekúl alebo fragmentov molekúl prostredníctvom zaznamenávania žiarenia emitovaného v rámci objektu, ktorý je predmetom štúdie. Kvantitatívna autorádiografia celého tela v porovnaní s disekciou orgánov môže mať výhody pri hodnotení distribúcie testovanej chemikálie a pri hodnotení celkovej výťažnosti a rozkladu rádioaktívneho materiálu v tkanivách. Významnou výhodou je napríklad možnosť využitia na modeli zvieraťa s pigmentáciou na účely hodnotenia možnej súvislosti testovanej chemikálie s melanínom, ktorý môže viazať určité molekuly. Hoci táto metóda môže zabezpečiť vhodné zobrazenia celého tela s miestami viazania s vysokou kapacitou a nízkou afinitou, môže mať obmedzenia pri detegovaní špecifických cieľových miest, ako sú miesta viazania receptorov, kde je na detekciu potrebné pomerne vysoké rozlíšenie a vysoká citlivosť. Ak sa použije autorádiografia, pokusy určené na stanovenie hmotnostnej bilancie podanej zlúčeniny sa vykonajú ako samostatná skupina alebo v rámci samostatnej štúdie oddelenej od pokusu na zistenie distribúcie v tkanivách, kde sa všetky exkréty (ktoré môžu zahŕňať aj vydychovaný vzduch) a celé mŕtve telá homogenizujú a vyšetria pomocou kvapalinovej scintilačnej spektroskopie.

Exkrécia žlčou: exkrécia prostredníctvom žlčovodu.

Bioakumulácia: pozri „akumulácia“.

Biodostupnosť: časť podanej dávky, ktorou sa dosahuje systémový obeh alebo ktorá je dostupná na mieste fyziologickej aktivity. Zvyčajne sa biodostupnosť testovanej chemikálie vzťahuje na materskú zlúčeninu, ale môže sa vzťahovať aj na jej metabolit. Zohľadňuje iba jednu chemickú formu. *Poznámka* biodostupnosť a absorpcia nie je to isté. Rozdiel medzi napríklad orálnou absorpciou (t. j. prítomnosťou v črevnej stene a v portálnom obehu) a biodostupnosťou (t. j. prítomnosťou v systémovej krvi a v tkanivách) môže vzniknúť v súvislosti s chemickým rozkladom v dôsledku metabolizmu črevnej steny alebo v dôsledku spätného odtoku do črevného lumenu alebo predsystémového metabolizmu v pečeni okrem iných faktorov (10). Biodostupnosť toxickej zložky (materskej zlúčeniny alebo metabolitu) je kritický parameter pri hodnotení rizika pre človeka (extrapolácia vysokých a nízkych dávok, extrapolácia jednotlivých spôsobov expozície) na odvodenie internej hodnoty z externej úrovne NOAEL alebo BMD (aplikovanej dávky). Na vznik účinkov na pečeň po orálnom podaní je postačujúca orálna absorpcia. V prípade každého účinku, ktorý sa prejaví inde ako pri vstupnej bráne, je však vo všeobecnosti spoľahlivejším parametrom, ktorý možno ďalej použiť pri hodnotení rizík, biodostupnosť, nie absorpcia.

Bioperzistencia: pozri „perzistencia“.

▼M4

Biotransformácia: (zvyčajne enzýmová) chemická premena skúmanej testovanej chemikálie na inú chemikáliu v tele. Synonymom je „metabolizmus“.

C_{max}: buď maximálna (vrcholová) koncentrácia v krvi (v plazme/sére) po podaní alebo maximálna (vrcholová) exkrécia (v moči alebo vo výkaloch) po podaní.

Klírens: kvantitatívny ukazovateľ rýchlosti, ktorou sa testovaná chemikália odstraňuje z krvi, plazmy alebo určitého tkaniva za jednotku času.

Kompartment: štrukturálna alebo biochemická zložka (alebo jednotka) tela, tkaniva alebo bunky, ktorá ja oddelená od zvyšku.

Detoxifikačné cesty: súbor krokov, ktoré vedú k odstráneniu toxických chemikálií z tela buď metabolickou premenou, alebo exkréciou.

Distribúcia: disperzia testovanej chemikálie a jej derivátov v organizme.

Enzýmy/izozýmy: bielkoviny, ktoré katalyzujú chemické reakcie. Izozýmy sú enzýmy, ktoré katalyzujú podobné chemické reakcie, ale líšia sa svojou sekvenciou aminokyselín.

Enzýmové parametre: K_m: Michaelisova konštanta a V_{max}: maximálna rýchlosť.

Exkrécia: proces/procesy, ktorým/ktorými sa podaná testovaná chemikália a/alebo jej metabolity odstraňujú z tela.

Exogénne: zavedené z prostredia mimo organizmu alebo systému alebo vytvorené v prostredí mimo organizmu alebo systému.

Extrapolácia: odvodenie jednej alebo viacerých neznámych hodnôt na základe toho, čo je známe alebo bolo pozorované.

Polčas ($t_{1/2}$): čas potrebný na pokles koncentrácie testovanej chemikálie v kompartmente na polovicu. Zvyčajne sa vzťahuje na koncentráciu v plazme alebo na množstvo testovanej chemikálie v celom tele.

Indukcia/enzýmová indukcia: enzýmová syntéza ako reakcia na environmentálny podnet alebo induktorovú molekulu.

Linearita/lineálna kinetika: proces je lineárny z hľadiska kinetiky, ak sú všetky rýchlosti prechodu medzi kompartmentmi priamo úmerné prítomným množstvám alebo koncentráciám, t. j. sú prvého rádu. Následne sú klírens a objemy distribúcie konštantné, rovnako ako polčasy. Dosiahnuté koncentrácie sú priamo úmerné miere dávkovania (expozícii) a akumulácia sa dá ľahšie predpovedať. Linearitu/nelinearitu možno hodnotiť porovnaním príslušných parametrov, napr. AUC, po rôznych dávkach alebo po jednorazovej a opakovanej expozícii. Chýbajúca závislosť od dávky môže indikovať nasýtenie enzýmov podieľajúcich sa na metabolizme zlúčeniny, rast krivky AUC po opakovanej expozícii v porovnaní s jednorazovou expozíciou môže indikovať inhibíciu metabolizmu a klesanie krivky AUC môže indikovať indukciu metabolizmu [pozri aj bod (11)].

▼M4

Hmotnostná bilancia: započítanie vstupov a výstupov testovanej chemikálie do/zo systému.

Materiálová bilancia: pozri „hmotnostná bilancia“.

Mechanizmus (druh) toxicity/mechanizmus (druh) pôsobenia: mechanizmus pôsobenia sa vzťahuje na špecifické biochemické interakcie, prostredníctvom ktorých testovaná chemikália vytvára svoj účinok. Druhom pôsobenia sa myslia bežné cesty vedúce k toxicite testovanej chemikálie.

Metabolizmus: synonymom je „biotransformácia“.

Metabolity: produkty metabolizmu alebo metabolických procesov.

Orálna absorpcia: percento dávky testovanej chemikálie absorbované z miesta podania (t. j. z gastrointestinálneho traktu). Tento kritický parameter možno použiť na zistenie frakcie podanej testovanej chemikálie, ktorá sa dostane do vrátnice a následne do pečene.

Rozdeľovací koeficient: takisto známy ako distribučný koeficient, je ukazovateľ diferenčnej rozpustnosti chemikálie v dvoch rozpúšťadlách.

Vrcholové úrovne v krvi (plazme/sére): maximálna (vrcholová) koncentrácia v krvi (plazme/sére) po podaní (pozri aj „C_{max}“).

Perzistencia (bioperzistencia): dlhodobá prítomnosť chemikálie (v biologickom systéme) v dôsledku rezistencie voči rozkladu/eliminácii.

Krížový prístup: informácie o parametri jednej alebo viacerých chemikálií sa použijú na predpovedanie parametra cieľovej chemikálie.

Receptorová mikroskopická autorádiografia (alebo receptorová mikroautorádiografia): túto metódu možno použiť na zistenie xenobiotickej interakcie so špecifickými miestami tkanív alebo s bunkovými populáciami, ako napríklad pri štúdiách viazania receptorov alebo špecifického druhu pôsobenia, ktoré môžu vyžadovať vysoké rozlíšenie a vysokú citlivosť, ktoré nemožno dosiahnuť inými metódami, ako je napríklad autorádiografia celého tela.

Spôsob podania (orálny, IV, dermálny, inhalačný atď.): vzťahuje sa na spôsob, akým sa chemikálie podajú do tela (napr. orálne cez sondu, orálne v krmive, dermálne, inhaláciou, intravenózne atď.).

Nasýtenie: stav, v ktorom jeden alebo viacero kinetických (napr. absorpcia, metabolizmus alebo klírens) procesov dosiahli maximum (teda „sú nasýtené“).

Citlivosť: schopnosť metódy alebo nástroja rozlišovať medzi reakciami merania predstavujúcimi rôzne úrovne skúmanej premennej.

Stabilné úrovne v krvi (plazme): nerovnovážny stav otvoreného systému, v ktorom sú všetky sily pôsobiace na systém presne vyvážené protichodnými silami takým spôsobom, že jeho zložky majú stabilnú koncentráciu, hoci dochádza k toku čiastočiek cez systém.

Modelovanie systémov (fyziologicky založené toxikokinetické, farmakokineticky založené, fyziologicky založené farmakokinetické, biologicky založené atď.): abstraktný model, ktorý využíva matematický jazyk na opis správania systému.

Cieľové tkanivo: tkanivo, v ktorom sa preukazuje hlavný nepriaznivý účinok toxikantu.

▼**M4**

Testovaná chemikália: akákoľvek chemikália alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Distribúcia v tkanivách: reverzibilný pohyb testovanej chemikálie z jedného miesta v tele na iné miesto. Distribúciu v tkanivách možno študovať pomocou disekcie orgánov, homogenizácie, horenia a kvapalinovej scintilačnej spektroskopie alebo kvalitatívnej a/alebo kvantitatívnej autorádiografie celého tela. Prvý spôsob je užitočný na získanie koncentrácie a percenta výťažnosti z tkanív a zvyškov mŕtveho tela tých istých zvierat, ale nemusí zabezpečovať dostatočné rozlíšenie pre všetky tkanivá a môže mať nižšiu ako ideálnu celkovú výťažnosť (< 90 %). Vymedzenie druhej metódy pozri vyššie.

$\mathbf{T_{max}}$: čas na dosiahnutie C_{max}.

Toxikokinetika (farmakokinetika): štúdia absorpcie, distribúcie, metabolizmu a exkrécie chemikálií za určitý čas.

Validácia (overenie) modelov: proces hodnotenia vhodnosti modelu s cieľom konzistentne opísať dostupné toxikokinetické údaje. Modely možno hodnotiť prostredníctvom štatistického a vizuálneho porovnania predpovedí modelov s experimentálnymi hodnotami a spoločnej nezávislej premennej (napr. času). Rozsah hodnotenia je potrebné odôvodniť v súvislosti s plánovaným využitím modelu.

▼B

B.37. ONESKORENÁ NEUROTOXICITA ORGANOFOSFOROVYCH LÁTOK PO AKÚTNEJ EXPOZÍCII ICH ÚČINKOM

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Pri stanovení a vyhodnotení toxických účinkov látok je dôležité zvážiť potenciál určitých skupín látok spôsobujúcich špecifické druhy neurotoxicity, ktoré nemusia byť zistené (objavené) v iných štúdiách toxicity. U určitých organofosforových zlúčenín sa zistilo, že spôsobujú oneskorenú neurotoxicitu a je nutné ich z tohto hľadiska hodnotiť.

Látky, ktoré môžu spôsobovať oneskorenú polyneuropatiu sa identifikujú pri použití screeningových testov *in vitro*; pravdaže, negatívne výsledky z *in vitro* štúdií neposkytujú dôkaz, že testovaná látka nie je neurotoxická.

Pozri aj všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIE

Organofosforové zlúčeniny zahŕňajú nenabité organofosforové estery, tioestery alebo anhydridy organofosforečných, organofosfónových alebo organofosforamidových kyselín, alebo príbuzných tiolfosforových, tiónfosforových, tiolfosfónových, tiónfosfónových alebo fosforotioamínových kyselín, alebo iné látky spôsobujúce oneskorenú neurotoxicitu občas pozorovanú v tejto kategórie látok.

Oneskorená neurotoxicita je syndróm spájaný s predĺženým oneskorením nábehu ataxie, distálnej axonopatie v mieche a periférnom nervstve, a inhibíciou a starnutím neuropatiou postihnutej esterázy (NTE) v nervových tkanivách.

1.3. REFERENČNÉ LATKY

Referenčná látka sa môže testovať s pozitívnou kontrolnou skupinou ako prostriedok dôkazu, že za daných laboratórnych testovacích podmienok sa odozva testovaných druhov zvierat významne nemení.

Ako príklad široko používaného neurotoxikantu slúži tri-o-tolylfosfát (CAS 78-30-8, EINECS 201-103-5, CAS názov: fosforečná kyselina, tris(2-metylfenyl)ester, známy tiež ako tris-o-krezylfosfát.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Skupine sliepok domácich, ktoré sú (ak je to vhodné) chránené od akútneho cholinergného účinku, sa orálne podáva jedna dávka testovanej látky. Zvieratá sa pozorujú 21 dní, pričom sa sledujú abnormality v správaní, ataxia, a paralýza. Biochemické merania a najmä inhibícia neuropatiou postihnutej esterázy (NTE) sa vykonávajú na náhodne vybraných sliepkach každej skupiny, bežne 24 a 48 hodín po podaní látky. 21 dní po expozícii sa zvyšok sliepok usmrtí a uskutoční sa histopatologické vyšetrenie vybraných nervových tkanív.

▼B

1.5. POPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.5.1. **Príprava**

Náhodne sa vyberú mladé zdravé dospelé sliepky, ktoré netrpia vírovou chorobou a nie sú podrobené lekárskej terapii, ktoré by rušili pozorovania, a zaradia sa do testovanej a kontrolnej skupiny. Najmenej 5 dní pred začiatkom testovania sa aklimatizujú na laboratórne podmienky.

Použijú sa dostatočne veľké klietky alebo ohrady, aby umožňovali voľný pohyb sliepok a jednoduché pozorovanie chôdze.

Orálne dávkovanie testovanej látky sa bežne uskutočňuje pomocou žalúdočnej sondy, želatínových kapsúl alebo porovnateľným spôsobom. Kvapaliny sa dávkujú neriedené alebo rozpustené vo vhodnom nosiči (napríklad kukuričný olej); Pevné látky sa rozpustia, ak je to možné vzhľadom na veľkosť dávky, v želatínových kapsulách, čím nemusí byť zabezpečená účinná absorpcia. Toxické vlastnosti nevodných nosičov by mali byť známe a ak nie sú, musia byť pred testovaním stanovené.

1.5.2. **Podmienky testovania**

1.5.2.1. *Testované zvieratá*

Doporučujú sa mladé dospelé domáce sliepky *(Gallus gallus domesticus)* vo veku 8 až 12 mesiacov. Používa sa štandardná veľkosť chovov a pokolení a sliepky musia byť chované za podmienok umožňujúcich im voľný pohyb.

1.5.2.2. *Počet a pohlavie*

Okrem testovanej skupiny sa používa aj kontrolná skupina s nosičom aj pozitívna kontrolná skupina. Kontrolná skupina s nosičom je testovaná rovnako ako testovaná skupina s tým rozdielom, že sa im nepodáva testovaná látka.

Vhodný počet vtákov v každej skupine sa určí tak, že najmenej šesť jedincov môže byť usmrtených na biochemické stanovenia (tri v obidvoch časových bodoch) a šesť musí prežiť 21 dní pozorovacieho obdobia na patologické vyšetrenie.

Pozitívna kontrolná skupina sa sleduje súčasne alebo v nedávnej minulosti. Má obsahovať minimálne šesť sliepok, ktoré sú testované známym oneskorovacím neurotoxikantom. Tri sliepky sa použijú na biochemické stanovenia a tri na patologické vyšetrenie. Doporučuje sa periodické obnovovanie údajov z minulosti. Nové pozitívne kontrolné údaje sa získavajú vtedy, ak sa v testovacom laboratóriu zmení niektorá podstatná riadiaca zložka testu (pokolenie, potrava, podmienky ubytovania).

▼B

1.5.2.3. *Úrovne dávok*

Stanovenie úrovne dávky neskôr použitej v hlavnej štúdii sa uskutočňuje v predbežnej štúdii, pri ktorej sa používa vhodný počet sliepok a hladín. Väčšinou je v predbežnej štúdii nevyhnutné úmrtie, aby sa zistila postačujúca dávka pre hlavnú štúdiu. Zabrániť úmrtiu spôsobenému akútnym cholinergickým účinkom sa môže využitím atropínu alebo iných ochranných činidiel, o ktorých je známe, že rušivo nevplývajú na oneskorené neurotoxické reakcie. Na odhad maximálnej neletálnej dávky testovanej látky je k dispozícii množstvo testovacích metód (pozri metódu B.1 bis). Pri výbere dávky pomáhajú tiež údaje získané testovaním sliepok z minulosti a iné toxikologické informácie.

Dávka testovanej látky v hlavnej štúdii má byť tak vysoká ako je len možné, s ohľadom na výsledky výberu dávky predbežnej štúdie a najvyššiu limitnú dávku 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti. Možné úmrtie by nemalo rušivo vplývať s postačujúcim počtom prežitých zvierat na biochemické vyšetrenie (šesť) a histológiu (šesť) po 21 dňoch. Atropín alebo iné ochranné činidlá, o ktorých je známe, že rušivo nevplývajú na oneskorené neurotoxické reakcie, by mal byť použitý, aby sa predišlo úmrtiu testovaných zvierat v dôsledku akútneho cholinergického účinku.

1.5.2.4. *Limitný test*

Ak sa test na úrovni dávky 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň uskutočňuje použitím postupov popísaných v tejto štúdii a neboli pozorované žiadne toxické účinky, a ak sa neočakáva toxicita ani na základe údajov štruktúrne príbuzných zlúčenín, potom štúdia pri vyššej hladine nie je nevyhnutná. Výnimkou je prípad, keď expozícia človeka indikuje potrebnosť skúmania na vyššej hladine, a vtedy sa používa limitný test.

1.5.2.5. **Doba pozorovania**

Doba pozorovania je 21 dní.

1.5.3. **Postup**

Po použití ochranného činidla na zabránenie úmrtia v dôsledku akútneho cholinergického účinku sa podáva testovaná látka v jednej dávke.

1.5.3.1. Celkové pozorovania

Pozorovania začínajú ihneď po expozícii. Všetky sliepky sa starostlivo pozorujú niekoľkokrát počas prvých dvoch dní a potom najmenej raz denne počas 21 dní alebo do plánovaného usmrtenia. Všetky toxické príznaky sa zaznamenávajú, vrátane času nábehu, druhu, prudkosti a dĺžky trvania abnormalít správania. Ataxia sa meria v rádovej odstupňovanej mierke na najmenej štyroch úrovniach a sleduje sa paralýza. Najmenej dvakrát za týždeň sú sliepky určené na patologické vyšetrenie vybrané z klietok a podrobené cyklu vynútenej motorickej aktivity, ako je vyliezame po rebríku, s cieľom umožniť pozorovanie minimálnych toxických účinkov. Umierajúce zvieratá a zvieratá viditeľne trpiace alebo viditeľne pociťujúce bolesť sa odstránia, humánne usmrtia a prevedie sa ich pitva.

▼B

1.5.3.2. Telesná hmotnosť

Všetky sliepky sa vážia krátko pred podaním testovanej látky a najmenej každý týždeň potom.

1.5.3.3. Biochémia

Šesť sliepok náhodne vybraných z každej testovanej a kontrolnej skupiny s nosičom, a tri sliepky z pozitívnej kontrolnej skupiny (ak je táto skupina testovaná súčasne) sa usmrtí do niekoľkých dní po expozícii. Mozog a miecha sa pripravia a analyzujú na neuropatiu inhibície aktivity cieľovej esterázy. Naviac môžu byť použité na prípravu a analýzu neuropatie inhibície aktivity cieľovej esterázy sedacieho ischiatického nervového tkaniva. Normálne sa po 24 hodinách usmrtia tri sliepky kontrolnej a každej testovanej skupiny a tri po 48 hodinách, zatiaľ čo po 24 hodinách sa usmrtia tri sliepky pozitívnej kontrolnej skupiny. Ak pozorovania klinických príznakov intoxikácie (tie bývajú často zistené pozorovaním času nábehu cholinergických príznakov) naznačujú, že zvieratá sa toxického činidla zbavujú veľmi pomaly, potom sa uprednostňuje odoberanie vzoriek tkanív z troch vtákov po 24 a až 72 hodinách po podaní.

Pokiaľ sa usúdi, že to je potrebné, tieto vzorky sa používajú aj na analýzu acetylcholínesterázy (AchE). Spontánna reaktivácia AchE však môže nastať aj *in vivo*, čo vedie k podhodnoteniu potenciálu látky ako inhibítora AchE.

1.5.3.4. Makroskopická pitva

Pitva všetkých zvierat (plánovane usmrtených aj usmrtených z dôvodu umierania) zahŕňa pozorovanie vzhľadu mozgu a miechy.

1.5.3.5. Histopatologické vyšetrenie

Nervové tkanivo zo zvierat, ktoré prežili pozorovaciu periódu a neboli použité na biochemické štúdie, sa podrobí mikroskopickému vyšetreniu. Tkanivá musia byť fixované použitím premývacích metód *in situ*. Časti zahŕňajú mozoček (stredne pozdĺžna úroveň), predĺženú miechu, miechu, a periférne nervy. Časti miechy sa zoberú z horného krčného úseku, strednej hrudníkovej a bedrovokrížovej oblasti. Berú sa aj časti distálnej oblasti holenných nervov a ich vetvy vedúcich k dvojhlavému lýtkovému svalu a sedacie nervy. Sekcie sa zafarbia vhodným myelínom a axonovo určitými farbivami.

2. **ÚDAJE**

Negatívne výsledky vybraných parametrov tejto metódy (biochémia, histopatológia a pozorovanie správania) normálne nevyžadujú ďalšie testovanie na oneskorenú neurotoxicitu. Nejednoznačné alebo nepresvedčivé výsledky týchto parametrov si môžu vyžadovať ďalšie vyhodnotenie.

Musia sa zabezpečiť individuálne údaje. Naviac musia byť všetky údaje zhrnuté v tabuľkovej forme pre každú testovanú skupinu s počtom použitých zvierat na začiatku testu, počtom zvierat, u ktorých sa prejavili známky poškodenia, účinkov na správanie alebo biochemických účinkov, typy a prudkosť týchto poškodení alebo účinkov, percentuálne množstvo zvierat prejavujúcich jednotlivý typ a prudkosť poškodenia alebo účinku.

▼B

Nálezy pochádzajúce z tejto štúdie sa vyhodnotia z hľadiska rozsahu, intenzity a korelácie so správaním, biochemických a histopatologických účinkov, a ďalších pozorovaných účinkov u testovanej a kontrolnej skupiny.

Ak je to možné, numerické výsledky sa vyhodnotia vhodnou a všeobecne prijateľnou štatistickou metódou. Štatistická metóda sa vyberá počas plánovania štúdie.

3. **SPRÁVA**

SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu má obsahovať, pokiaľ je to možné, nasledujúce informácie:

3.1. Testované zvieratá:

— použitý kmeň,

— počet a vek zvierat,

— zdroj, podmienky bývania, atď.,

— individuálne hmotnosti zvierat na začiatku testu.

3.2. Testovacie podmienky:

— podrobnosti o príprave testovanej látky, jej stabilite a homogenite, pokiaľ je to možné,

— zdôvodnenie výberu nosiča,

— podrobnosti o podávaní testovanej látky,

— podrobnosti o kvalite krmiva a pitnej vody,

— zdôvodnenie voľby výberu dávky,

— spresnenie podávaných dávok, vrátane podrobností o nosiči, objeme a fyzikálnej forme podávanej látky,

— totožnosť a podrobnosti o podávanom ochrannom činidle.

3.3. Výsledky:

— údaje o telesných hmotnostiach,

— toxické reakcie podľa úrovne dávky, vrátane úmrtnosti,

— povaha, intenzita a dĺžka trvania klinických pozorovaní (či boli reverzibilné alebo nie),

— podrobný opis biochemických metód a zistení,

— pitevné nálezy,

— podrobný popis všetkých histopatologických nálezov,

— štatistické spracovanie výsledkov, ak je vhodné.

Diskusia.

Záver.

4. **ODKAZY**

Táto metóda je obdobná OECD TG 418.

▼B

B.38. **ONESKORENÁ NEUROTOXICITA ORGANOFOSFOROVYCH LÁTOK PRI 28-DŇOVEJ ŠTÚDII OPAKOVANEJ DÁVKY**

1. **METODA**

1.1. ÚVOD

Pri stanovení a vyhodnotení toxických účinkov látok je dôležité zvážiť potenciál určitých kategórií látok spôsobujúcich určité druhy neurotoxicity, ktoré nemusia byť zistené v iných štúdiách toxicity. U určitých organofosforových látok sa zistilo, že spôsobujú oneskorenú neurotoxicitu a je nutné ich z tohto hľadiska hodnotiť.

Látky, ktoré môžu spôsobovať oneskorenú polyneuropatiu sa identifikujú pri použití screeningových testov *in vitro*; pravdaže, negatívne výsledky z *in vitro* štúdií neposkytujú dôkaz, že testovaná látka nie je neurotoxická.

28-dňový test oneskorenej neurotoxicity poskytuje informácie o možných zdravotných rizikách, pravdepodobne sa zvyšujúcich po opakovanej expozícii cez obmedzené časové obdobie. Test poskytuje informácie o odozve na dávku a môže tiež umožňovať odhad hodnoty nepozorovaných žiadnych nepriaznivých účinkov, na základe ktorej je možné stanoviť kritérium bezpečnosti expozície.

Pozri aj všeobecný úvod časť B.

1.2. DEFINÍCIE

Organofosforové látky zahŕňajú nenabité organofosforové estery, tioestery alebo anhydridy organofosforečných, organofosfónových alebo organofosforamidových kyselín, alebo príbuzných tiolfosforových, tiónfosforových, tiolfosfónových, tiónfosfónových alebo fosforotioamidových kyselín, alebo iné látky spôsobujúce oneskorenú neurotoxicitu občas pozorovanú v tejto kategórie látok.

Oneskorená neurotoxicita je syndróm spájaný s predĺženým oneskorením nábehu ataxie, distálnej axonopatie v mieche a periférnom nervstve, a inhibíciou a starnutím neuropatiou postihnutej esterázy (NTE) v nervových tkanivách.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Denné dávky testovanej látky sa orálne podávajú sliepkam domácim počas 28 dní. Zvieratá sa pozorujú prinajmenšom denne a sledujú sa abnormality správania, ataxia a paralýza až do 14 dní po poslednej dávke: Biochemické merania a najmä inhibícia neuropatiou postihnutej esterázy (NTE) sa vykonávajú na náhodne vybraných sliepkach každej skupiny, bežne 24 a 48 hodín po podaní látky. Dva týždne po poslednej dávke sa zvyšok sliepok usmrtí a uskutoční sa histopatologické vyšetrenie vybraných nervových tkanív.

▼B

1.4. POPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Príprava**

Náhodne sa vyberú mladé zdravé dospelé sliepky, ktoré netrpia vírovou chorobou a nie sú podrobené lekárskej terapii, a bez abnormalít chôdze, čo by rušilo pozorovania, a zaradia sa do testovanej a kontrolnej skupiny. Najmenej 5 dní pred začiatkom testovania sa aklimatizujú na laboratórne podmienky.

Použijú sa dostatočne veľké klietky alebo výbehy, aby umožňovali voľný pohyb sliepok a jednoduché pozorovanie chôdze.

Orálne sa dávkuje každý deň, 7 dní do týždňa a uprednostňuje sa podávanie pomocou žalúdočnej sondy alebo želatínových kapsúl. Tekutiny sa dávkujú neriedené alebo rozpustené vo vhodnom nosiči (napríklad kukuričný olej). Pevné látky sa rozpustia, ak je to možné vzhľadom na veľkosť dávky, v želatínových tobolkách, čím nemusí byť zabezpečená účinná absorpcia. Toxické vlastnosti nevodných nosičov by mali byť známe a ak nie sú, musia byť pred testovaním stanovené.

1.4.2. **Podmienky testovania**

1.4.2.1. *Testované zvieratá*

Oporučujú sa mladé dospelé domáce sliepky (*Gallus gallus domesticus*) vo veku 8 až 12 mesiacov. Používa sa štandardná veľkosť chovov a pokolení a sliepky musia byť chované za podmienok umožňujúcich im voľný pohyb.

1.4.2.2. *Počet a pohlavie*

Všeobecne sa používajú najmenej tri testované skupiny a kontrolná skupina s nosičom. Kontrolná skupina s nosičom je testovaná rovnako ako testovaná skupina s tým rozdielom, že sa im nepodáva testovaná látka.

Vhodný počet sliepok v každej skupine sa určí tak, že najmenej šesť jedincov môže byť usmrtených na biochemické stanovenia (tri v obidvoch časových bodoch) a šesť musí prežiť 14 dní pozorovacieho obdobia na patologické vyšetrenie.

1.4.2.3. *Hladiny dávok*

Dávky sa vyberajú so zreteľom na tri výsledky získané pri akútnom teste oneskorenej neurotoxicity a ďalších prístupných údajov o toxicite alebo kinetike testovanej látky. Najvyššia dávka sa vyberá s cieľom indukovania toxických účinkov, pričom sa uprednostňuje oneskorená neurotoxicita, ale bez toho, aby spôsobovala uhynutie alebo očividné trápenie zvierat. Podľa toho sa vyberá zostupujúca postupnosť dávok so zámerom dokázať závislosť odozvy od dávky a pri najnižšej dávke dokázať aj hladinu, pri ktorej nebol pozorovaný žiadny nepriaznivý účinok.

▼B

1.4.2.4. *Limitný test*

Ak sa test na úrovni dávky 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň uskutočňuje použitím postupov popísaných v tejto štúdii a neboli pozorované žiadne toxické účinky, a ak sa neočakáva toxicita ani na základe údajov štruktúrne príbuzných zlúčenín, potom štúdia pri vyššej hladine nie je nevyhnutná. Výnimkou je prípad, ak expozícia človeka indikuje potrebnosť skúmania na vyššej hladine, a vtedy sa používa limitný test.

1.4.2.5. *Doba pozorovania*

Všetky zvieratá sa pozorujú prinajmenšom denne počas expozičného obdobia a 14 dní potom, s výnimkou plánovanej pitvy.

1.4.3. **Postup**

Zvieratám sa podáva testovaná látka sedem dní v týždni počas obdobia 28 dní.

1.4.3.1. *Celkové pozorovania*

Pozorovania začínajú ihneď po začatí expozície. Všetky sliepky sa starostlivo pozorujú prinajmenšom raz denne počas 28 dní a potom 14 dní alebo až do plánovaného usmrtenia. Všetky toxické príznaky sa zaznamenávajú, vrátane času nábehu, druhu, intenzity a dĺžky trvania príznakov. Do pozorovaní sa zahŕňa sledovanie abnormalít správania, ale aj ďalšie príznaky. Ataxia sa meria v rádovej odstupňovanej mierke na najmenej štyroch úrovniach a sleduje sa paralýza. Najmenej dvakrát za týždeň sú sliepky, určené na patologické vyšetrenie, vybrané z klietok a podrobené cyklu vynútenej motorickej aktivity, ako je vyliezanie po rebríku, s cieľom umožniť pozorovanie minimálnych toxických účinkov. Umierajúce zvieratá a zvieratá viditeľne trpiace alebo viditeľne pociťujúce bolesť sa odstránia, humánne usmrtia a prevedie sa ich pitva.

1.4.3.2. *Telesná hmotnosť*

Všetky sliepky sa zvážia krátko pred prvým podaním testovanej látky a najmenej každý týždeň potom.

1.4.3.3. *Biochémia*

Šesť sliepok náhodne vybraných z každej testovanej a kontrolnej skupiny s nosičom sa usmrtí do niekoľkých dní po poslednej dávke. Mozog a bedrová miecha sa pripravia a analyzujú na neuropatiu inhibície aktivity cieľovej esterázy (NTE). Naviac môžu byť použité na prípravu a analýzu neuropatie inhibície aktivity cieľovej esterázy sedacieho ischiatického nervového tkaniva na neuropatiu inhibície aktivity cieľovej esterázy (NTE). Normálne sa po 24 hodinách usmrtia tri sliepky kontrolnej a každej testovanej skupiny a tri po 48 hodinách po poslednej dávke. Ak údaje získané pri akútnej štúdii alebo pri iných štúdiach (napríklad toxikokinetiky) naznačujú, že je výhodnejší iný čas usmrtenia zvierat po podaní poslednej dávky, potom sa použije tento čas a zdôvodní sa.

Pokiaľ sa usúdi, že to je potrebné, tieto vzorky sa používajú aj na analýzu acetylcholínesterázy (AchE). Spontánna reaktivácia AchE však môže nastať aj *in vivo*, čo vedie k podhodnoteniu potenciálu látky ako inhibítora AchE.

▼B

1.4.3.4. *Makroskopická pitva*

Pitva všetkých zvierat (plánovane usmrtených aj usmrtených z dôvodu umierania) zahŕňa pozorovanie vzhľadu mozgu a miechy.

1.4.3.5. *Histopatologické vyšetrenie*

Nervové tkanivo zo zvierat, ktoré prežili pozorovaciu periódu a neboli použité na biochemické štúdie, sa podrobí mikroskopickému vyšetreniu. Tkanivá musia byť fixované použitím premývacích metód *in situ*. Časti zahŕňajú mozoček (stredne pozdĺžna úroveň), predĺženú miechu, miechu, a periférne nervy. Časti miechy sa odoberú z horného krčného úseku, strednej hrudníkovej a bedrovokrížovej oblasti. Odoberú sa aj časti distálnej oblasti holenných nervov a ich vetvy do dvojhlavých lýtkových svalov a sedacie ischiatické nervy. Sekcie sa zafarbia vhodným myelínom a axónovo určitými farbivami. Zo začiatku sa mikroskopické vyšetrenie uskutočňuje s konzervovanými tkanivami všetkých zvierat kontrolnej skupiny a skupiny testovanej pri vysokej dávke. Ak je mikroskopické vyšetrenie na prítomnosť účinkov pozitívne, uskutoční sa aj u sliepok zo skupín testovaných so strednou a nízkou dávkou.

2. **ÚDAJE**

Negatívne výsledky vybraných parametrov tejto metódy (biochémia, histopatológia a pozorovanie správania) normálne nevyžadujú ďalšie testovanie na oneskorenú neurotoxicitu. Nejednoznačné alebo nepresvedčivé výsledky týchto parametrov si môžu vyžadovať ďalšie vyhodnotenie.

Musia sa zabezpečiť individuálne údaje. Naviac musia byť všetky údaje zhrnuté v tabuľkovej forme pre každú testovanú skupinu s počtom použitých zvierat na začiatku testu, počtom zvierat, u ktorých sa prejavili známky poškodenia, účinkov na správanie alebo biochemických účinkov, typy a intenzitu týchto poškodení, alebo účinkov, a percentuálne množstvo zvierat vykazujúce jednotlivý typ a prudkosť poškodenia alebo účinku.

Nálezy pochádzajúce z tejto štúdie sa vyhodnotia z hľadiska rozsahu, intenzity a korelácie so správaním, biochemických a histopatologických účinkov, a ďalších pozorovaných účinkov u každej testovanej a kontrolnej skupiny.

Ak je to možné, číselné výsledky sa vyhodnotia vhodnou a všeobecne prijateľnou štatistickou metódou. Štatistická metóda sa vyberá počas plánovania štúdie.

3. **SPRÁVA**

SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu má obsahovať, pokiaľ je to možné, nasledujúce informácie:

3.1. Testované zvieratá:

— použitý kmeň,

— počet a vek zvierat,

— zdroj, podmienky bývania, atď.,

— individuálne hmotnosti zvierat na začiatku testu.

▼B

3.2. Testovacie podmienky:

— podrobnosti o príprave testovanej látky, jej stabilite a homogenite, pokiaľ je to možné,

— zdôvodnenie výberu nosiča,

— podrobnosti o podávaní testovanej látky,

— podrobnosti o kvalite krmiva a pitnej vody,

— zdôvodnenie voľby výberu dávky,

— spresnenie podávaných dávok, vrátane podrobností o nosiči, objeme a fyzikálnej forme podávanej látky,

— zdôvodnenie voľby pre výber iných časov biochemického stanovenia ako je 24 a 48 hodín.

3.3. Výsledky:

— údaje o telesných hmotnostiach,

— toxické reakcie podľa úrovne dávky, vrátane úmrtnosti,

— hodnota nepozorovaných žiadnych nepriaznivých účinkov,

— povaha, intenzita a dĺžka trvania klinických pozorovaní (či boli reverzibilné alebo nie),

— podrobný opis biochemických metód a zistení,

— pitevné nálezy,

— podrobný opis všetkých histopatologických nálezov,

— štatistické spracovanie výsledkov, ak je vhodné.

Diskusia.

Záver.

4. **ODKAZY**

Táto metóda je obdobná OECD TG 419.

▼B

B.39. TEST NEPLÁNOVANEJ SYNTÉZY DNA (UNSCHEDULED DNA SYNTHESIS – UDS) S PEČEŇOVÝMI BUNKAMI CICAVCOV *IN VIVO*

1. METODA

Táto metóda je obdobou OECD TG 486, testu neplánovanej syntézy DNA (Unscheduled DNA Synthesis – UDS) s pečeňovými bunkami cicavcov *in vivo* (1997).

1.1. ÚVOD

Účelom testu neplánovanej syntézy DNA (Unscheduled DNA Synthesis – UDS) s pečeňovými bunkami cicavcov *in vivo* je identifikovať testovacie látky, ktoré indukujú opravu DNA v pečeňových bunkách pokusných zvierat (1) (2) (3) (4).

Tento *in vivo* test poskytuje metódu na skúmanie genotoxických účinkov chemikálií v pečeni. Meraným parametrom je dôkaz poškodenia DNA a následná oprava v pečeňových bunkách. Pečeň je zvyčajne hlavným miestom metabolizmu absorbovaných zmesí. Poškodenia DNA je preto vhodné merať *in vivo*.

Ak existujú dôkazy, že testovacia látka nedosiahne cieľové tkanivo, nie je vhodné tento test použiť.

Koncový bod neplánovanej syntézy DNA (UDS) sa meria stanovením absorpcie označených nukleozidov v bunkách, ktoré neprechádzajú plánovanou (S-fáza) syntézou DNA. Najpoužívanejšou technikou je stanovenie absorpcie trítiom označeného tymidínu (^{3}H-TdR) autorádiografiou. Pre *in vivo* testy UDS sa používajú najmä krysie pečene. Použiť sa môžu aj iné ako pečeňové tkanivá, tie ale nie sú predmetom tejto metódy.

Zistenie UDS závisí od počtu báz DNA odstránených a nahradených na mieste poškodenia. Test UDS je preto osobitne hodnotný na zistenie „dlhej opravy“ (20–30 báz) indukovanej látkou. „Krátka oprava“ (jedna až tri bázy) sa naopak zisťuje s omnoho menšou citlivosťou. Z dôvodu neopravenia, nesprávnej opravy alebo nesprávnej replikácie lézií DNA môžu vzniknúť mutagénne udalosti. Rozsah reakcie UDS neposkytuje žiadny náznak kvality opravného procesu. Je ďalej možné, že mutagén reaguje s DNA, ale poškodenie DNA nie je opravené odstraňovacím opravným procesom. Nedostatok špecifických informácií o mutagénnej aktivite poskytnutý testom UDS je kompenzovaný potenciálnou citlivosťou tohto parametra, pretože sa meria na celom genóme.

Pozri tiež všeobecný úvod k časti B.

1.2. DEFINÍCIE

Opravované bunky: čisté jadrové vlákno (net nuclear grain – NNG) vyššie ako stanovená hodnota, adjustuje sa v laboratóriu vykonávajúcom test.

Čisté jadrové vlákno (net nuclear grain – NNG): kvantitatívny ukazovateľ aktivity UDS buniek pri autorádiografických testoch UDS vypočítaný odpočítaním priemerného počtu cytoplazmatických vlákien v cytoplazmatických oblastiach ekvivalentných jadru (CG) od počtu jadrových vlákien (NG): NNG = NG – CG. Počty NNG sa vypočítavajú pre jednotlivé bunky a potom spočítavajú pre bunky v kultúre, v paralelných kultúrach, atď.

▼B

Neplánovaná syntéza DNA (UDS): opravná syntéza DNA po odstránení časti DNA obsahujúcej oblasť poškodenia indukovaného chemickými látkami alebo fyzikálnymi činiteľmi.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Test UDS s pečeňovými bunkami cicavcov naznačuje opravnú syntézu DNA po odstránení časti DNA obsahujúcej oblasť poškodenia indukovaného chemickými látkami alebo fyzikálnymi činiteľmi. Test je zvyčajne založený na aplikácii ^{3}H-TdR do pečeňových buniek DNA, ktoré majú nízku frekvenciu buniek v S-fáze bunkového cyklu. Absorpcia ^{3}H-TdR sa zvyčajne stanovuje autorádiografiou, keďže táto metóda nie je tak citlivá na rušenie z buniek v S-fáze, ako napríklad počítanie kvapalnej scintilácie.

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Prípravné práce**

1.4.1.1. *Výber živočíšnych druhov*

Bežne sa používajú krysy, hoci použiť sa dajú aj iné vhodné druhy cicavcov. Vyberajú sa bežne používané laboratórne kmene mladých zdravých dospelých zvierat. Na začiatku štúdie by mala byť hmotnostná variácia zvierat minimálna a nemala by presiahnuť ± 20 % strednej hmotnosti každého pohlavia.

1.4.1.2. *Podmienky umiestnenia a kŕmenia*

Používajú sa všeobecné podmienky uvedené vo všeobecnom úvode k časti B, cieľovou hodnotou vlhkosti je 50 % až 60 %.

1.4.1.3. *Príprava zvierat*

Zdravé, mladé, dospelé zvieratá sa náhodne rozdelia do kontrolných a pokusných skupín. Klietky sú umiestnené tak, aby sa minimalizovali možné účinky vyplývajúce z rozmiestnenia klietok. Zvieratá sa jednotlivo označia. Zvieratá sa aklimatizujú na laboratórne podmienky najmenej päť dní pred začatím štúdie.

1.4.1.4. *Príprava dávok*

Pevné testovacie látky sa rozpúšťajú a ukladajú v príslušných rozpúšťadlách alebo nosičoch, a ak je potrebné, rozrieďujú sa pred podávaním dávok zvieratám. Kvapalné testovacie látky sa podávajú priamo, alebo rozriedené pred podávaním. Používajú sa čerstvé prípravky testovacej látky, pokiaľ údaje o stabilite nepoukazujú na vhodnosť uskladnenia.

1.4.2. **Podmienky testov**

1.4.2.1. *Rozpúšťadlo/nosič*

Rozpúšťadlo/nosič by nemali vyvolávať toxické účinky v používaných úrovniach dávok a nemali by chemicky reagovať s testovacou látkou. Ak sa používajú iné ako dobre známe rozpúšťadlá/nosiče, ich použitie by malo byť podporené údajmi označujúcimi ich kompatibilitu. Odporúča sa zvážiť, kedykoľvek je to možné, použitie vodného rozpúšťadla/nosiča.

▼B

1.4.2.2. *Kontrolné skupiny*

Pri každej nezávisle uskutočňovanej časti pokusu sa vytvoria pozitívne a negatívne (rozpúšťadlo/nosič) kontrolné skupiny. Okrem podania testovacej látky sa so zvieratami v kontrolných skupinách zaobchádza rovnakým spôsobom ako s pokusnými zvieratami.

Pozitívnym kontrolným skupinám sa podávajú látky, u ktorých je známa tvorba UDS pri podaní na úrovni expozície, pri ktorej sa očakáva zistiteľný nárast proti pozadiu. Pozitívne kontrolné skupiny vyžadujúce metabolickú aktiváciu sa používajú pri dávkach vyvolávajúcich mierne reakcie (4). Dávky sa volia tak, aby boli účinky zjavné, ale aby pozorovateľovi priamo neodhaľovali identitu kódovaných vzoriek. Príklady látok pre pozitívne kontrolné skupiny:

Odber vzorky	Latka	č. CAS	č. EINECS
skorý odber (2–4 hodiny)	N-nitrozodimetylamín	62-75-9	200-249-8
neskorý odber (12–16 hodin)	N-2-fluorenylacetamid (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Pre pozitívne kontrolné skupiny sa môžu použiť aj iné vhodné látky. Je prijateľné, aby pozitívnym kontrolným skupinám boli látky podávané spôsobom odlišným od testovacej látky.

1.5. POSTUP

1.5.1. **Počet a pohlavie zvierat**

Používa sa primeraný počet zvierat tak, aby bola zohľadnená prirodzená biologická variácia pri reakcii na test. Počet zvierat činí najmenej tri analyzovateľné zvieratá na skupinu. Ak existujú dostatočné historické údaje, pre súčasné negatívne a pozitívne kontrolné skupiny sa vyžaduje jedno alebo dve zvieratá.

Ak v čase uskutočnenia štúdie sú dostupné údaje zo štúdií rovnakých druhov používajúce rovnaké spôsoby expozície, ktoré ukazujú, že neexistujú významné rozdiely v toxicite medzi pohlaviami, postačuje aj testovanie jedného pohlavia, najlepšie samcov. Ak je expozícia chemikálií na ľudí závislá od pohlavia, ako napríklad pri niektorých farmaceutických prípravkoch, test sa uskutoční na zvieratách príslušného pohlavia.

1.5.2. **Harmonogram ošetrovania**

Testovacie látky sa podávajú jedenkrát.

1.5.3. **Úrovne dávok**

Zvyčajne sa používajú minimálne dve úrovne dávok. Najvyššia dávka sa definuje ako známky toxicity z dávky na takej úrovni, že vyššie úrovne dávok založené na rovnakom dávkovacom režime by pravdepodobne spôsobili úmrtnosť. Vo všeobecnosti by najnižšia dávka mala byť 50 % až 25 % najvyššej dávky.

▼B

Látky so špecifickými biologickými aktivitami pri nízkych netoxických dávkach (ako napríklad hormóny a mitogény) môžu byť výnimkou kritéria stanovenia dávky a hodnotia sa z prípadu na prípad. Ak sa z dôvodu nedostatku vhodných údajov uskutoční štúdia na zistenie rozsahu, vykoná sa v rovnakom laboratóriu, za použitia rovnakého druhu, rodu, pohlavia a dávkovacieho režimu ako v hlavnej štúdii.

Najvyššia dávka sa definuje ako dávka, ktorá spôsobuje známky toxicity v pečeni (napríklad: pyknotické jadrá).

1.5.4. **Limitný test**

Ak test pri jednej úrovni dávky najmenej 2 000 mg/kg telesnej hmotnosti pri jednom podaní alebo pri dvoch podaniach v jeden deň nevyvoláva žiadne toxické účinky a ak sa neočakáva genotoxicita na základe údajov zo štrukturálne príbuzných látok, úplná štúdia pri použití troch hladín dávkovania sa nepovažuje za potrebnú. Očakávaná expozícia na ľudí môže naznačovať potrebu vyššej úrovne dávky pri použití limitného testu.

1.5.5. **Podávanie dávok**

Testovacia látka sa zvyčajne podáva plnením žalúdka sondou s použitím žalúdočnej rúrky alebo vhodnej intubačnej kanyly alebo intraperitoneálnou injekciou. Iné spôsoby expozície sú prijateľné len so zdôvodnením. Intraperitoneálna cesta sa však neodporúča, pretože pečeň by mohla byť vystavená testovacej látke priamo a nie prostredníctvom obehového systému. Maximálny objem kvapaliny, ktorá sa môže naraz podávať sondou alebo injekciou závisí od veľkosti testovacieho zvieraťa. Objem by nemal presiahnuť 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. Použitie objemov vyšších ako tento sa musí zdôvodniť. Okrem dráždivých alebo žieravých látok, ktoré bežne odhalia zhoršené účinky s vyššími koncentráciami, sa variabilita testovacieho objemu minimalizuje upravením koncentrácie na zabezpečenie stáleho objemu na všetkých úrovniach dávok.

1.5.6. **Príprava pečeňových buniek**

Pečeňové bunky sa pripravujú z pokusných zvierat zvyčajne po 12 až 16 hodinách od podania. Vo všeobecnosti je potrebný aj ďalší odber vzorky (zvyčajne po dvoch až štyroch hodinách od podania dávky), pokiaľ neexistuje jasná pozitívna reakcia po 12 až 16 hodinách. Odber vzoriek sa môže uskutočniť aj v inom čase, ak je to zdôvodnené na základe toxikokinetických údajov.

Krátkodobé kultúry pečeňových buniek cicavcov sa zvyčajne tvoria perfúzovaním pečene in situ kolagenázou a umožnením čerstvo oddelených pečeňových buniek zachytiť sa na vhodnom povrchu. Pečeňové bunky z negatívnych kontrolných skupín zvierat by mali mať životaschopnosť (5) najmenej 50 %.

1.5.7. **Stanovenie UDS**

Čerstvo izolované pečeňové bunky cicavcov sa inkubujú s médiom obsahujúcim ^{3}H-TdR primerane dlho, napríklad: tri až osem hodín. Na konci inkubačnej doby sa oddelí médium od buniek, pričom tieto môžu byť inkubované s médiom obsahujúcim nadbytočný neoznačený tymidín na zníženie neprirodzenej rádioaktivity („studený lov“). Bunky sa následne očistia, fixujú a nechajú vysušiť. Pri dlhších inkubačných časoch nie je studený lov potrebný. Sklíčka sa namočia do autorádiografickej emulzie, vystavia do tmy (napríklad: pri chladení počas 7 až 14 dní), vyvolajú, zafarbia a následne sa spočítajú exponované striebristé vlákna. Z každého zvieraťa sa pripravujú dve až tri sklíčka.

▼B

1.5.8. **Analýza**

Sklíčka obsahujú dostatočný počet buniek s normálnou morfológiou na umožnenie cieleného hodnotenia UDS. Preparáty sa mikroskopicky skúmajú na známky otvorenej cytotoxicity (napríklad: pyknóza, znížené hodnoty včlenenia rádioaktívnych alebo ťažkých izotopov).

Sklíčka sa pred rátaním vlákien označia kódmi. Z každého zvieraťa sa z minimálne dvoch sklíčok hodnotí 100 buniek; hodnotenie menej ako 100 buniek/zviera sa zdôvodní. Počty vlákien sa nehodnotia na S-fázové jadrá, avšak je možné zaznamenať podiel S-fázových buniek.

Množstvo aplikovaného ^{3}H-TdR do jadra a cytoplazmy morfologicky normálnych buniek podľa rozloženia striebristých vlákien sa stanovuje vhodnou metódou.

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Uvádzajú sa údaje za každé zviera a sklíčko. údaje o jednotlivých zvieratách sa uvádzajú v tabuľkovej forme. Počet čistých jadrových vlákien (NNG) sa vypočítava pre každú bunku, pre každé zviera a pre každú dávku a čas odpočítaním počtu CG od počtu NG. Ak sa počítajú „opravované bunky“, kritériá pre definovanie „opravovaných buniek“ sa zdôvodnia a založia na historických alebo súčasných údajoch o negatívnych kontrolných skupinách. Numerické výsledky sa môžu hodnotiť štatistickými metódami. Ak sa použijú štatistické testy, vyberajú sa a zdôvodňujú pred uskutočnením štúdie.

2.2. HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Príklady kritérií pre pozitívne/negatívne reakcie zahŕňajú:

pozitívne	i)	hodnoty NNG nad stanovenou hranicou, ktorá je zdôvodnená na základe laboratórnych historických údajov,
alebo	ii)	hodnoty NNG oveľa vyššie ako hodnoty súčasnej kontrolnej skupiny;
negatívne	i)	hodnoty NNG v rámci/pod historickou prahovou hodnotou kontrolnej skupiny
alebo	ii)	hodnoty NNG nie oveľa vyššie ako hodnoty súčasnej kontrolnej skupiny.

▼B

Zvažuje sa biologická relevantnosť výsledkov, t. j. do úvahy sa berú parametre ako variácia medzi zvieratami, vzťah medzi dávkou a reakciou a cytotoxicita. Ako pomôcka sa pri hodnotení výsledkov testov používajú štatistické metódy. Štatistický význam nie je jediným určujúcim faktorom pre pozitívnu reakciu.

Hoci väčšina pokusov poskytne jasne pozitívne alebo negatívne výsledky, v zriedkavých prípadoch údaje vopred vylúčia jednoznačné posúdenie aktivity testovacej látky. Výsledky môžu ostať nejasné alebo spochybniteľné bez ohľadu na počet opakovaní pokusu.

Pozitívne výsledky testu UDS s pečeňovými bunkami cicavcov *in vivo* naznačujú, že testovacia látka vyvoláva poškodenie DNA v pečeňových bunkách *in vivo*, ktoré sa dajú opraviť neplánovanou syntézou DNA *in vitro*. Negatívne výsledky naznačujú, že v testovacích podmienkach testovacia látka neindukuje poškodenie DNA zistiteľné týmto testom.

Mala by sa prediskutovať pravdepodobnosť, že testovacia látka dosiahne všeobecnú obehovú sústavu alebo špecificky cieľové tkanivo (napríklad: systémová toxicita).

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu zahŕňa nasledovné informácie:

Rozpúšťadlo/nosič:

— zdôvodnenie voľby nosiča,

— rozpustnosť a stabilita testovacej látky v rozpúšťadle/nosiči, ak je známa.

Testovacie zvieratá:

— použitý druh/kmeň,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky chovu, strava atď.,

— individuálna hmotnosť zvierat na začiatku testu, vrátane rozsahu telesnej hmotnosti, strednej hodnoty a štandardnej odchýlky pre každú skupinu.

Podmienky testov:

— pozitívne a negatívne (rozpúšťadlo/nosič) kontrolné skupiny,

— údaje zo štúdie na zistenie rozsahu, ak bola uskutočnená,

— zdôvodnenie voľby úrovne dávok,

— podrobnosti o príprave testovacej látky,

— podrobnosti o podávaní testovacej látky,

— zdôvodnenie voľby spôsobu podávania,

— metódy overenia, že testovacia látka dosiahla všeobecnú obehovú sústavu alebo cieľové tkanivo, ak je to vhodné,

▼B

— konverzia z koncentrácie testovacej látky v strave/vode (ppm) na samotnú dávku (mg/kg/telesná hmotnosť/deň), ak je to vhodné,

— podrobnosti o kvalite stravy a vody,

— podrobný opis harmonogramu podávania a odberu vzoriek,

— metódy merania toxicity,

— metóda prípravy pečeňových buniek a kultúr,

— použitá autorádiografická technika,

— počet pripravených sklíčok a počet hodnotených buniek,

— hodnotiace kritériá,

— kritériá hodnotenia pokusov ako pozitívne, negatívne alebo nejasné.

Výsledky:

— stredné hodnoty jadrových vlákien, cytoplazmatických vlákien a čistých jadrových vlákien podľa jednotlivých sklíčok, zvierat a skupín,

— vzťah medzi dávkou a reakciou, ak je to možné,

— štatistické analýzy, ak boli použité,

— známky toxicity,

— súčasné údaje o negatívnych (rozpúšťadlo/nosič) a pozitívnych kontrolných skupinách,

— historické údaje o negatívnych (rozpúšťadlo/nosič) a pozitívnych kontrolných skupinách s rozsahmi, strednými hodnotami a štandardnými odchýlkami,

— počet „opravovaných buniek“, ak bol stanovený,

— počet buniek v S-fáze, ak bol stanovený,

— životaschopnosť buniek.

Rozbor výsledkov.

Závery.

4. **LITERATÚRA**

Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B. and Penman, M.G. (1985). An Assessment of the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA Repair Assay. Mutation Res., 156, 1 – 18.

Butterworth, B.E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G. (1987). A Protocol and Guide for the *In Vivo* Rat Hepatocyte DNA-Repair Assay. Mutation Res., 189, 123 – 133.

Kennelly, J.C., Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P.A., Burlinson, B., Benford, D.J., Dean, S.W. and Mitchell, I. de G. (1993). In Vivo Rat Liver UDS Assay. In: Kirkland D.J. and Fox M., (Eds) Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52 – 77.

▼B

Madle, S., Dean, S.W., Andrae, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D.J., Furihata, C, Hertner, T., McQueen, C.A. and Mori, H. (1993). Recommendations for the Performance of UDS Tests *In Vitro* and In *Vivo*. Mutation Res., 312, 263 – 285.

Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993). Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the *In Vivo/In Vitro* DNA Repair Assay (UDS). Mutation Res., 291, 21 – 27.

Mirsalis, J.C., Tyson, C.K. and Butterworth, B.E. (1982). Detection of Genotoxic Carcinogens in the *In Vivo/In Vitro* Hepatocyte DNA Repair Assay. Environ. Mutagen, 4, 553 – 562.

▼B

B.40. **POLEPTANIE KOŽE *IN VITRO:* TEST POMOCOU TRANSKUTÁNNEHO ELEKTRICKÉHO ODPORU (TER)**

1. **METODA**

Táto testovacia metóda je ekvivalentná OECD TG 430 (2004).

1.1. ÚVOD

Poleptaním kože sa rozumie nevratné poškodenie tkaniva kože po aplikácii testovaného materiálu [v znení definície podľa Globálne harmonizovaného systému klasifikácie a označovania chemických látok a zmesí (GHS)] (1). Táto metóda poskytuje postup posudzovania žieravosti, ktorý sa nevykonáva na živých zvieratách.

Posudzovanie žieravých účinkov na kožu sa zvyčajne vykonávalo na laboratórnych zvieratách (2). Snaha o obmedzenie bolesti a utrpenia zvierat v súvislosti s týmto postupom viedla k takej revízii testovacej metódy B.4, ktorou sa umožňuje stanoviť poleptanie kože pomocou alternatívnych metód *in vitro,* čo umožňuje vylúčiť bolesť a utrpenie zvierat.

Prvým krokom k vymedzeniu alternatívnych testov, ktorými by sa umožnilo testovať žieravé účinky na kožu na účely regulácie, bolo uskutočnenie prevalidačných štúdií (3). Potom sa vykonala riadna validačná štúdia metód *in vitro* (6) (7) (8) na posúdenie poleptania kože (4) (5). Výsledky z týchto štúdií a z ďalších publikácií viedli k odporúčaniu, že na posúdenie žieravých účinkov na kožu *in vivo* by sa mohli použiť tieto testy (9) (10) (11): test na modeli ľudskej kože (pozri testovaciu metódu B.40bis) a test transkutánneho elektrického odporu (táto metóda).

Vo validačnej štúdii a ďalších publikovaných štúdiách sa uvádza, že skúškou na transkutánny elektrický odpor (TER) potkanej kože (12) (13) je možné spoľahlivo rozlišovať medzi známymi látkami so žieravými účinkami na kožu a látkami, ktoré nemajú žieravé účinky (5) (9).

Testom opísaným v tejto metóde sa umožňuje identifikovať žieravé chemické látky a zmesi. Ďalej sa ním umožňuje identifikovať nežieravé látky a zmesi, ak sa podporí dôkaznými stanoveniami založenými na ďalších existujúcich údajoch (napr. pH, vzťahy medzi štruktúrou a aktivitou, údaje o vplyve na človeka a/alebo na zvieratá) (1) (2) (11) (14). Test neposkytuje údaje o dráždivých účinkoch na kožu, ani neumožňuje ďalšiu kategorizáciu žieravých látok, ako to umožňuje Globálne harmonizovaný systém klasifikácie (GHS) (1).

Na úplné vyhodnotenie lokálnych účinkov na kožu po jednorazovej expozícii pokožky sa odporúča dodržiavať stratégiu sekvenčného testovania, ako je uvedené v testovacej metóde B.4 (2) a ako je stanovené v Globálne harmonizovanom systéme (1). Táto stratégia testovania zahŕňa vykonávanie testov poleptanie kože *in vitro* (ako je opísané v tejto metóde) a dráždivosť pre kožu pred zvážením testovania na živých zvieratách.

▼B

1.2. VYMEDZENIE POJMOV

Poleptanie kože *in vivo:* je vznik nevratného poškodenia kože: najmä viditeľná nekróza postihujúca epidermu a zasahujúca do dermy, ktorá nastane do štyroch hodín po aplikácii testovanej látky. Typickými reakciami na poleptanie sú vredy, krvácanie, krvavé chrasty a na konci štrnásťdňového pozorovania strata farby v dôsledku vyblednutia kože, úplné ložiská alopécie a jazvy. Na vyhodnotenie problematických lézií by sa malo uvažovať o histopatológii.

Transkutánny elektrický odpor (TER): je miera elektrickej impedancie kože vyjadrená ako hodnota odporu v kiloohmoch. Jednoduchá a robustná metóda posúdenia bariérovej funkcie spočíva v zaznamenávaní prechodu iónov cez kožu s použitím aparatúry s Wheatstonovým mostíkom.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Tabuľka 1

Referenčné chemické látky

Názov	Č. EINECS	Č. CAS	
propan-l,2-diamin	201-155-9	78-90-0	silno žieravý
kyselina akrylova	201-177-9	79-10-7	silno žieravá
2-terc- butylfenol	201-807-2	88-18-6	žieravý
hydroxid draselny (10 %)	215-181-3	1310-58-3	žieravý
kyselina sirova (10 %)	231-639-5	7664-93-9	žieravá
kyselina oktanova (kaprylova)	204-677-5	124-07-02	žieravá
4H- 1,2,4-triazol-4-ylamin	209-533-5	584-13-4	nežieravý
eugenol	202-589-1	97-53-0	nežieravý
fenetylbromid	203-130-8	103-63-9	nežieravý
tetrachloretylen	204-825-9	27-18-4	nežieravý
kyselina izostearova	250-178-0	30399-84-9	nežieravá
4-(metylsulfanyl)benzaldehyd	222-365-7	3446-89-7	nežieravý

Väčšina z uvedených chemických látok je prevzatá zo zoznamu chemických látok vybratých pre medzinárodnú validačnú štúdiu ECVAM (4). Ich výber sa zakladá na týchto kritériách:

i) rovnaký počet žieravých a nežieravých látok;

▼B

ii) komerčne dostupné látky, ktoré sa vzťahujú na väčšinu relevantných tried chemických látok;

iii) zahrnutie silno žieravých aj menej žieravých látok s cieľom umožniť rozlišovanie na základe schopnosti leptať;

iv) voľba chemických látok, s ktorými možno manipulovať v laboratóriu bez vážnych nebezpečenstiev iných ako je žieravosť.

1.4. PODSTATA TESTOVACEJ METÓDY

Testovaný materiál sa aplikuje až 24 hodín na epidermálny povrch kožných terčíkov v dvojkomorovom testovacom systéme, v ktorom tieto kožné terčíky majú funkciu deliacej steny medzi komorami. Kožné terčíky sa odoberú z potkanov vo veku 28 až 30 dní, ktoré boli usmrtené šetrným spôsobom. Žieravé materiály sa identifikujú podľa ich schopnosti spôsobovať stratu normálnej integrity a bariérovej funkcie rohovitej vrstvy *(stratum corneum),* ktorá sa meria ako zníženie TER pod prahovú úroveň (12). Pre potkanov bola vybratá ako referenčná prahová hodnota TER 5 k'Ω na základe rozsiahlych údajov pre široký okruh chemických látok, pre ktoré hodnota TER v prevažnej väčšine prípadov bola buď značne nad touto hodnotou (často > 10 kΩ), alebo značne pod ňou (často < 3 kΩ) (12). Všeobecne povedané, materiály, ktoré nie sú žieravé pre zvieratá, ale sú dráždivé alebo nedráždivé, neznižujú TER pod túto referenčnú prahovú hodnotu. Okrem toho, používanie iných kožných prípravkov alebo iného zariadenia si môže vynútiť zmenu voľby referenčnej prahovej hodnoty a jej ďalšiu validáciu.

Do testovacieho postupu je na potvrdenie pozitívnych výsledkov vrátane hodnôt TER okolo 5 kΩ zaradený krok na stanovenie viazania farbiva. Týmto krokom viazania farbiva sa stanovuje, či zvýšenie priepustnosti iónov je v dôsledku fyzického porušenia rohovitej vrstvy *(stratum corneum)*. Ukázalo sa, že metóda TER s využitím kože potkana umožňuje predvídať výsledky zisťovania žieravosti *in vivo* s králikmi podľa testovacej metódy B.4 (2). Malo by sa uviesť, že test *in vivo* na králikoch je veľmi konzervatívny vzhľadom na žieravé a dráždivé účinky na kožu v porovnaní s testom na ľudskej koži pomocou náplasti (15).

1.5. POPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.5.1. **Zvieratá**

Vybratým živočíšnym druhom sú potkany, pretože citlivosť ich kože na chemické látky sa v tomto teste v minulosti preukázala (10). Vek (v čase odberu kože) a kmeň potkanov sú osobitne dôležité na zabezpečenie toho, aby folikuly chlpov boli v latentnej fáze, predtým než začne rast zrelej srsti.

▼B

Chrbtová a bočná srsť mladých, približne 22-denných samcov alebo samíc potkanov (z kmeňa príbuzného Wistaru alebo porovnateľného kmeňa) sa opatrne odstráni malými nožnicami. Zvieratá sú potom umyté opatrným utieraním, pričom sa ostrihaná oblasť ponára do antibiotického roztoku (obsahujúceho napríklad streptomycín, penicilín, chloramfenikol a amfotericín v koncentráciách účinne inhibujúcich rast baktérií). Zvieratá sa na tretí alebo štvrtý deň po prvom omytí znova omyjú antibiotikami a použijú sa do 3 dní po druhom omytí, keď sa rohovitá vrstva *(stratum corneum)* po odstránení srsti zregeneruje.

1.5.2. **Príprava kožných terčíkov**

Zvieratá sa šetrným spôsobom usmrtia vo veku 28 až 30 dní; tento vek je kritický. Z každého zvieraťa sa potom odstráni chrbtová a bočná koža a nadbytočný podkožný tuk sa z kože opatrne zoškrabe. Odoberú sa kožné terčíky, z ktorých každý má priemer približne 20 mm. Koža sa pred použitím terčíkov môže uchovávať, ak sa preukázalo, že pozitívne a negatívne kontrolné údaje sú rovnocenné s tými, ktoré sa získali s čerstvou kožou.

Každý kožný terčík sa preloží cez jeden z koncov teflónov ej trubičky z PTFE (polytetrafluóretylén) tak, aby epidermálny povrch bol v kontakte trubičkou. Cez koniec trubičky sa natesno prevlečie gumený tesniaci krúžok, aby sa koža nepohybovala, a nadbytočné tkanivo sa oreže. Rozmery trubičky a tesniaceho krúžku sú uvedené na obrázku 2. Gumený tesniaci krúžok sa potom na koniec teflónovej (PTFE) trubičky opatrne a utesní vazelínou. Trubičku pridržiava v receptorovej komore obsahujúcej roztok $MgSO_4$ (154 mM) pružinová svorka (obrázok 1). Kožný terčík by sa mal úplne ponoriť do roztoku $MgSO_4$. Z jednej kože potkana možno získať 10 až 15 kožných terčíkov.

Pre každú zvieraciu kožu sa pred začatím testovania zmeria elektrický odpor dvoch kožných terčíkov ako postup kontroly kvality. Ak sa pri tomto teste majú použiť ostatné terčíky, pre obidva terčíky by mala byť nameraná hodnota odporu väčšia ako 10 kQ. Ak je hodnota odporu nižšia ako 10 kQ, zvyšné terčíky z tejto kože by sa mali z testov vyradiť.

1.5.3. **Aplikácia testovaných a kontrolných látok**

Pre každú štúdiu by sa mali súbežne použiť pozitívne a negatívne kontroly, aby sa zaručila dostatočná účinnosť daného experimentálneho modelu. Mali by sa použiť kožné terčíky z toho istého zvieraťa. Navrhovanými látkami pre pozitívnu kontrolu je 10 M kyselina chlorovodíková a pre negatívnu kontrolu destilovaná voda.

Na epidermálny povrch vnútri trubičky sa rovnomerne aplikujú tekuté testované látky (150 µl). Pri testovaní tuhých materiálov sa na terčík rovnomerne aplikuje dostatočné množstvo tuhej látky, aby bol pokrytý celý povrch epidermy. Na vrch tuhej látky sa pridá deionizovaná voda (150 µl) a trubička sa jemne pretrepe. S cieľom zaistiť maximálny styk látky s kožou môže vzniknúť potreba zohriať tuhé látky na 30 °C, aby sa testovaná látka roztavila alebo zmäkla, alebo ju treba pomlieť na zrnitý materiál alebo prášok.

▼B

Pre každú testovanú a kontrolnú látku sa použijú tri kožné terčíky. Testované látky sa aplikujú počas 24 hodín pri teplote 20 – 23 °C. Testovaná látka sa celkom odstráni umytím prúdom vody z vodovodu s teplotou do 30 °C.

1.5.4. **Merania TER**

Impedancia kože sa meria ako TER. TER sa meria použitím nízkonapäťového, Wheatstonovho meracieho mostíka na striedavý prúd (13). Všeobecné špecifikácie tohto mostíka: prevádzkové napätie 1 – 3 volty, sínusový alebo pravouhlý tvar kmitov striedavého prúdu s frekvenciou 50 – 1 000 Hz a rozsah merania najmenej 0,1 – 30 k Merací mostík použitý vo validačnej štúdii meria induktanciu, kapacitanciu a odpor až do hodnôt 2 000 H, 2 000 μF, a 2 MΩ pri frekvenciách 100 Hz alebo 1 kHz, s použitím sériových alebo paralelných hodnôt. Na účely merania TER v rámci skúšky žieravosti sa zaznamenávajú hodnoty odporu pri frekvencii 100 Hz a s použitím sériových hodnôt. Pred meraním elektrického odporu sa povrchové napätie kože zníži pridaním dostatočného množstva 70 % etanolu tak, aby sa epiderma zakryla. Po niekoľkých sekundách sa etanol z trubičky odstráni a tkanivo sa potom zvlhčí pridaním 3 ml roztoku $MgSO_4$ (154 mM). Elektródy meracieho mostíka sa umiestnia na obe strany kožného terčíka a zmeria sa odpor v kΩ/kožný terčík (obrázok 1). Rozmery elektródy a dĺžka exponovanej elektródy pod krokosvorkami sú uvedené na obrázku 2. Svorka vnútornej elektródy je počas merania opretá o horný koniec teflónovej trubičky, aby sa zaistilo, že sa dĺžka časti elektródy ponorenej v roztoku $MgSO_4$ nemení. Vonkajšia elektróda je umiestnená vo vnútri receptorovej komory tak, aby spočívala na dne komory. Vzdialenosť medzi pružinovou svorkou a dnom teflónovej trubičky sa udržiava konštantná (obrázok 2), pretože táto vzdialenosť má vplyv na nameranú hodnotu odporu. V dôsledku toho by vzdialenosť medzi vnútornou elektródou a kožným terčíkom mala byť konštantná a minimálna (1 – 2 mm).

Ak je nameraná hodnota odporu vyššia ako 20 kΩ, môže to byť spôsobené zvyškami testovanej látky na epidermálnej strane kožného terčíka. O ďalšie odstránenie tohto nánosu sa možno pokúsiť napríklad tak, že sa teflónová trubička zakryje palcom chráneným v rukavici a pretrepáva sa ňou približne 10 sekúnd; roztok $MgSO_4$ sa odstráni a meranie odporu sa opakuje s čerstvým $MgSO_4$.

Vlastnosti a rozmery testovacej aparatúry a použitý experimentálny postup môžu mať vplyv na namerané hodnoty TER. Referenčná prahová hodnota 5 kΩ pre leptavé účinky bola odvodená na základe údajov zistených špecifickou aparatúrou a postupom opísaným v tejto metóde. Ak sa zmenia podmienky testovania alebo sa použije iná aparatúra, môžu sa použiť iné prahové a kontrolné hodnoty. Preto je potrebné kalibrovať metodiku a prahové hodnoty odporu testovaním série referenčných štandardných materiálov vybratých z chemických látok použitých vo validačnej štúdii (4, 5), alebo z tried chemických látok podobných skúmaným chemikáliám. Súbor vhodných referenčných chemických látok sa uvádza v tabuľke 1.

▼B

1.5.5. **Metódy stanovenia viazania farbiva**

Expozícia kože určitým nežieravým materiálom môže mať za následok zníženie odporu pod prahovú hodnotu 5 kΩ, v dôsledku čoho sa umožní prienik iónov cez rohovitú vrstvu *(stratum corneum)* a znižuje sa elektrický odpor (5). Napríklad neutrálne organické látky a chemické látky (vrátane detergentov, emulzifikátorov a ostatných povrchovo aktívnych činidiel), ktoré majú povrchovo aktívne vlastnosti, môžu viesť k odstráneniu kožných lipidov, čím sa bariéra stane pre ióny priepustnejšia. Preto, ak sú hodnoty TER testovaných látok nižšie ako 5 kΩ, alebo sa pohybujú okolo 5 kΩ, a nie je viditeľné poškodenie, malo by sa vykonať posúdenie prieniku farbiva na kontrolných a upravených tkanivách, aby sa zistilo, či sú namerané hodnoty TER výsledkom zvýšenej priepustnosti kože alebo poleptania kože (3, 5). V prípade poleptania kože, keď sa *stratum corneum* poruší, farbivo sulforodamín B pri aplikácii na povrch kože rýchlo ňou preniká a sfarbuje podkladové tkanivo. Toto konkrétne farbivo je stabilné v prostredí širokého rozsahu chemických látok a nemá naň vplyv extrakčný postup opísaný ďalej.

1.5.5.1. *Aplikácia a odstránenie farbiva sulforodamínu B*

Po posúdení TER sa síran horečnatý odstráni z trubičky a koža sa pozorne preskúma, či nie je viditeľne poškodená. Ak zreteľné veľké poškodenie nie je viditeľné, aplikuje sa na epidermálnu stranu každého kožného terčíka počas 2 hodín 150 µl 10 % roztoku (m/V) farbiva sulforodamínu B (Acid Red 52; C.I. 45100; č. EINECS 222-529-8; č. CAS 3520-42-1) v destilovanej vode. Tieto kožné terčíky sa potom asi 10 sekúnd omývajú tečúcou vodou pri teplote zodpovedajúcej najviac izbovej teplote, aby sa odstránilo všetko nadbytočné/neviazané farbivo. Všetky kožné terčíky sa opatrne odoberú z teflónovej trubičky a umiestnia sa do liekovky (napr. sklenej scintilačnej liekovky s objemom 20 ml) obsahujúcej deionizovanú vodu (8 ml). Liekovky sa 5 minút ľahko pretrepávajú, aby sa odstránilo akékoľvek nadbytočné neviazané farbivo. Tento postup oplachovania sa zopakuje a potom sa kožné terčíky vyberú a vložia do liekoviek obsahujúcich 5 ml 30 % (hm/obj.) laurylsíranu sodného (SDS) v destilovanej vode a cez noc sa inkubujú pri teplote 60 °C.

Po inkubácii sa všetky kožné terčíky odstránia a zlikvidujú a zostávajúci roztok sa odstreďuje 8 minút pri teplote 21 °C (pri relatívnej odstredivej sile ~175 × g). Vzorka supernatantu s objemom 1 ml sa zriedi v pomere 1:5 (v/v) (t.j. 1 ml + 4 ml) s 30 % (w/v) SDS v destilovanej vode. Optická hustota (OD) roztoku sa meria pri 565 nm.

1.5.5.2. *Výpočet obsahu farbiva*

Obsah farbiva sulforodamínu B v kožnom terčíku sa vypočíta z hodnôt OD (5) (mólový extinkčný koeficient sulforodamín B pri 565 nm = 8,7 × 10^4; molekulová hmotnosť = 580). Obsah farbiva sa stanoví pre každý kožný terčík s využitím vhodnej kalibračnej krivky a potom sa vypočíta priemerný obsah farbiva pre replikáty.

2. **ÚDAJE**

Hodnoty odporu (kΩ) a prípadne hodnoty stredného obsahu farbiva (µg/terčík), pre testovaný materiál, ako aj pre pozitívne a negatívne kontroly by sa mali uviesť v podobe tabuľky (jednotlivé údaje z jednotlivých pokusov ich stredné hodnoty s ich ± smerodajnou odchýlkou), vrátane údajov o duplicitných/opakovaných experimentoch, a ich stredné a jednotlivé hodnoty.

▼B

2.1. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Stredné hodnoty výsledkov TER sú prijateľné, ak súbežne namerané hodnoty pre pozitívnu aj negatívnu kontrolu patria do prijateľného rozmedzia danej metódy v danom testovacom laboratóriu. Pre opísanú metodiku a aparatúru sú prijateľné hodnoty rozmedzia odporu uvedené v tejto tabuľke:

Kontrola	Látka	Rozsah odporu (kΩ)
pozitívna	10M kyselina chlorovodíková	0,5 – 1,0
negatívna	destilovaná voda	10 – 25

Výsledné stredné hodnoty viazania farbiva sú prijateľné, ak hodnoty pre súbežné kontroly spadajú do prijateľných rozmedzí danej metódy. Pre opísanú metodiku a aparatúru sú odporúčané prijateľné rozmedzia obsahu farbiva pre kontrolné látky uvedené v tejto tabuľke:

Kontrola	Látka	Rozsah obsahu farbiva (μg/terčík)
pozitívna	10M kyselina chlorovodíková	40 – 100
negatívna	destilovaná voda	15 – 35

Testovaná látka sa pokladá za látku, ktorá nie je žieravá pre kožu:

i) ak je stredná hodnota TER zmeraná pre testovanú látku vyššia než 5 kΩ, alebo

ii) ak je stredná hodnota TER nižšia alebo sa rovná 5 kΩ, a

— kožný terčík nevykazuje zreteľné poškodenie a

— stredný obsah farbiva na terčík je omnoho nižší než stredný obsah farbiva na terčík stanovený súbežnou pozitívnou kontrolou s 10M HCl.

Testovaná látka sa pokladá za látku žieravú pre kožu:

i) ak je stredná hodnota TER nižšia alebo sa rovná 5 kΩ a kožný terčík je zreteľne poškodený, alebo

ii) ak je stredná hodnota TER nižšia, alebo sa rovná 5 kΩ a

— kožný terčík nie je zjavne poškodený, ale

— priemerný obsah farbiva je pre testovanú látku vyšší alebo sa rovná strednému obsahu farbiva na terčík stanovenému súbežnou pozitívnou kontrolou s 10M HCl.

▼B

3. **SPRÁVY**

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Testované a kontrolné látky:

— chemický názov (chemické názvy) ako napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS a číslo CAS, ak je známe,

— čistota a zloženie látky alebo prípravku (v hmotnostných percentách) a fyzikálne vlastnosti,

— fyzikálno-chemické vlastnosti ako napríklad fyzikálny stav, pH, stabilita, rozpustnosť vo vode, relevantné pre vykonanie štúdie,

— úprava testovaných/kontrolných látok pred testovaním, pokiaľ je to vhodné (napr. zahriatie, rozomletie),

— stabilita, ak je známa.

Pokusné zvieratá:

— použitý kmeň a pohlavie,

— vek zvierat, ak sú použité ako darcovské zvieratá,

— zdroj, podmienky umiestnenia zvierat, výživa atď.,

— podrobnosti o príprave kože.

Testovacie podmienky:

— kalibračné krivky na testovacia aparatúra,

— kalibračné krivky na vykonanie testu účinnosti viazania farbiva,

— podrobnosti o použitom testovacom postupe na meranie TER,

— podrobnosti o testovacom postupe použitom na posúdenie viazania farbiva, v prípade potreby;

— opis všetkých modifikácií testovacích postupov,

— opis použitých hodnotiacich kritérií.

Výsledky:

— tabuľky s údajmi z merania hodnôt TER a prípadne obsahu viazaného farbiva pre jednotlivé zvieratá a jednotlivé vzorky kože;

— opis všetkých pozorovaných účinkov.

Rozbor výsledkov

Závery

4. **ODKAZY NA LITERATÚRU**

(1) OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

▼B

(2) Testing Method B.4. Acute Toxicity: Dermal Irritation/-Corrosion.

(3) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report and recommendations of ECVAM Workshop 6. ATLA 23, 219 – 255.

(4) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. in Vitro 12, 471 – 482.

(5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhütter, H.-G., and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxic. in Vitro 12, 483 – 524.

(6) OECD (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62 pp.

(7) Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem. J.H., Bruner. L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder. R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski. D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. The report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129 – 147.

(8) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxico logical Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam. niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf

(9) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275 – 280.

(10) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDermTM, EPISKINTM (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NIH Publication No. 02–4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddoc s/epis_brd.pdf.

(11) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st - 2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat

(12) Oliver, G.J.A., Pemberton, M.A., and Rhodes, C. (1986). An *in vitro* skin corrosivity test -modificationsand validation. Fd. Chem. Toxicol. 24, 507 – 512.

▼B

(13) Botham, P.A., Hall, T.J., Dennett, R., McCall, J.C., Basketter, D.A., Whittle, E., Cheeseman, M., Esdaile, D.J., and Gardner, J. (1992). The skin corrosivity test *in vitro:* results of an inter-laboratory trial. Toxic. in Vitro 6, 191 – 194.

(14) Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26: 709 – 720.

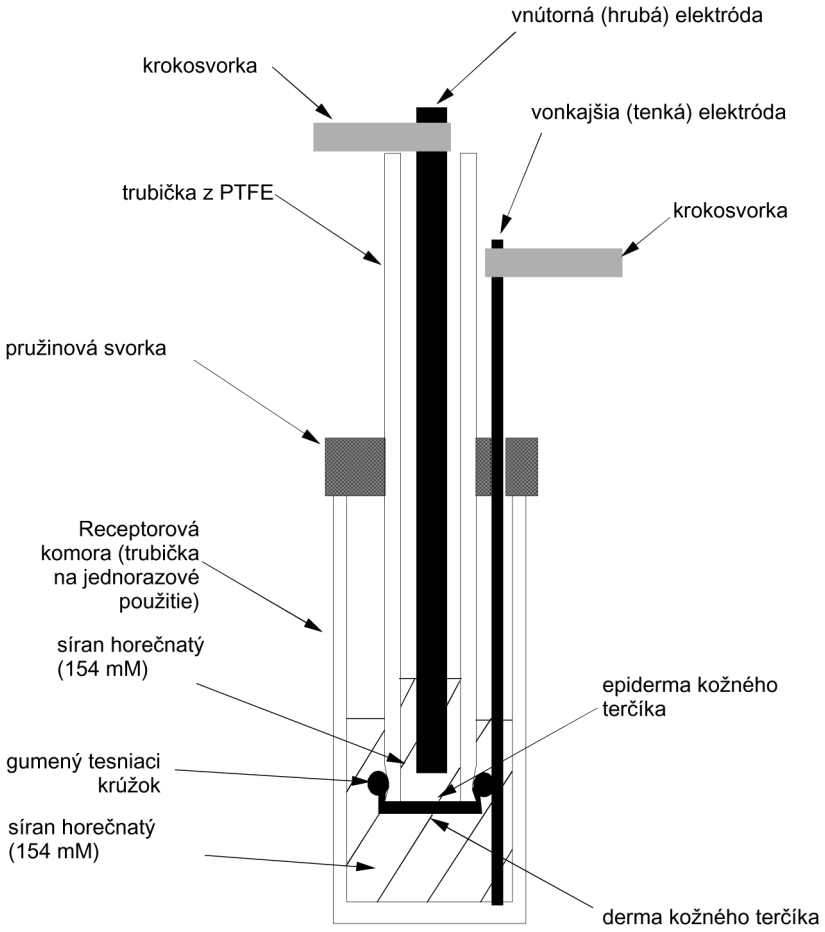
(15) Basketter, D.A., Chamberlain, M., Griffiths, H.A., Rowson, M., Whittle, E., York, M. (1997). The classification of skin irritants by human patch test. Fd. Chem. Toxicol. 35, 845 – 852.

(16) Oliver G.J.A, Pemberton M.A and Rhodes C. (1988). An In Vitro model for identifying skin-corrosive chemicals. I. Initial Validation. Toxic. in Vitro. 2, 7 – 17.

▼B

Obrázok 1

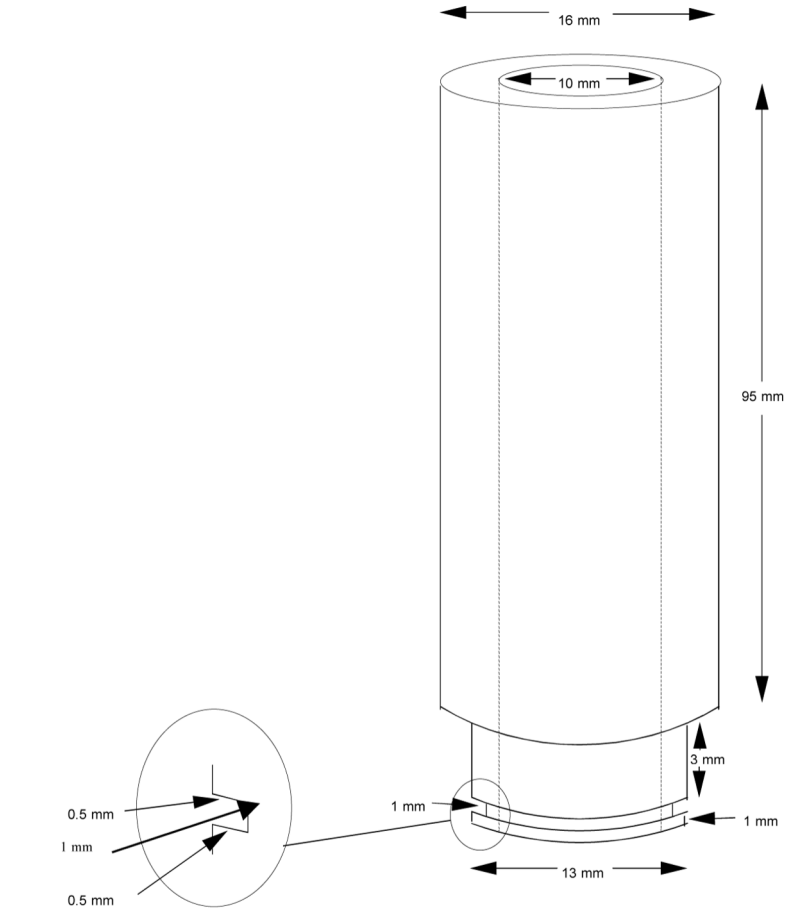
Aparatúra na meranie TER potkanej kože

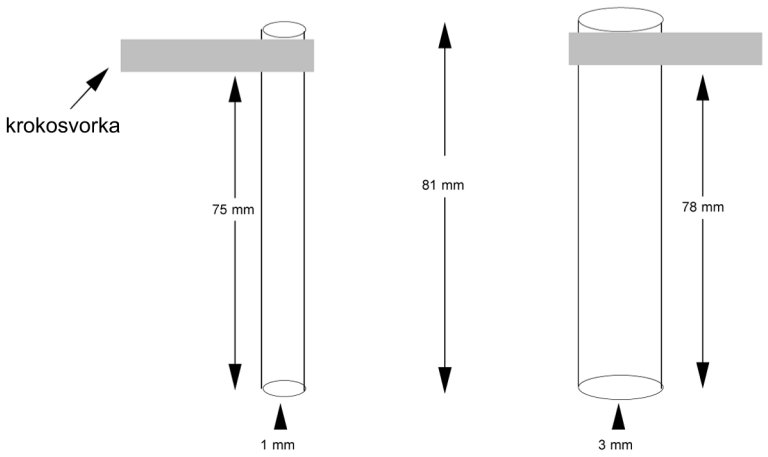


▼B

Obrázok 2

Rozmery teflónovej a receptorovej trubičky a použitých elektród





▼B

Rozhodujúce faktory zobrazenej aparatúry:

— vnútorný priemer trubičky z PTFE,

— dĺžka elektród vzhľadom na trubičku z PTFE a trubičku receptora taká, že elektródy nedosahujú ku kožnému terčíku a elektróda so štandardnou dĺžkou je v kontakte s roztokom $MgSO_4$,

— objem roztoku $MgSO_4$ v trubičke receptora by mal zaistiť hĺbku vrstvy tekutiny vzhľadom na úroveň trubičky z PFTE, ako je znázornené na obrázku 1,

— kožný terčík by mal byť k trubičke z PFTE pripevnený tak, aby elektrický odpor predstavoval skutočnú mieru vlastnosti kože.

▼B

B.40 BIS. **POLEPTANIE KOŽE *IN VITRO:* TEST POMOCOU MODELU ĽUDSKEJ KOŽE**

1. **METÓDA**

Táto testovacia metóda je ekvivalentná OECD TG 431 (2004).

1.1. ÚVOD

Poleptaním kože a rozumie nevratné poškodenie tkaniva kože po aplikácii testovaného materiálu [v znení definície podľa Globálne harmonizovaného systému klasifikácie a označovania chemických látok a zmesí (GHS)] (1). Pri tejto testovacej metóde nie sú na posúdenie žieravosti pre kožu potrebné živé zvieratá ani tkanivá zvierat.

Posudzovanie žieravosti pre kožu sa zvyčajne vykonávalo na laboratórnych zvieratách (2). Snaha o obmedzenie bolesti a utrpenia zvierat v súvislosti s týmto postupom viedla k takej revízii testovacej metódy B.4, ktorou sa umožňuje stanoviť poleptanie kože pomocou alternatívnych metód *in vitro,* čo umožňuje vylúčiť bolesti a utrpenie zvierat.

Prvým krokom k vymedzeniu alternatívnych testov, ktorými by sa umožnilo testovanie žieravých účinkov na kožu na účely regulácie, bolo vykonanie prevalidačných štúdií (3). Po nich sa vykonala riadna validačná štúdia metód *in vitro* (6), (7), (8) na posúdenie poleptania kože (4), (5). Výsledky z týchto štúdií a z iných publikácií (9) viedli k odporúčaniu, že na posúdenie žieravosti pre kožu *in vivo* by sa mohli použiť tieto testy (10), (11), (12), (13): test na modeli ľudskej kože (táto metóda) atest transkutánneho elektrického odporu (pozri testovaciu metódu B.40).

Vo validačných štúdiách sa uvádza, že testy s využitím modelov ľudskej kože (3), (4), (5), (9) umožňujú spoľahlivo rozlišovať medzi známymi látkami so žieravým účinkom na kožu a látkami, ktoré nemajú žieravé účinky. V protokole o teste sa takisto uvádza rozdiel medzi látkami so silnými a menej silnými žieravými účinkami na kožu.

Testom opísaným v tejto metóde sa umožňuje identifikovať žieravé chemické látky a zmesi. Takisto sa ním umožňuje identifikovať nežieravé látky a zmesi, ak sa podporí dôkaznými stanoveniami založenými na ďalších existujúcich informáciách (napríklad pH, vzťahy medzi štruktúrou a aktivitou, údaje o vplyve na človeka/zvieratá) (1), (2), (13), (14). Test bežne neposkytuje dostatočné údaje o dráždivých účinkoch na kožu, ani neumožňuje ďalšiu kategorizáciu žieravých látok, ako to umožňuje Globálne harmonizovaný systém klasifikácie (GHS)(1).

Na úplné vyhodnotenie lokálnych účinkov na kožu po jednorazovej expozícii pokožky sa odporúča dodržiavať stratégiu sekvenčného testovania, ako je uvedené v testovacej metóde B.4 (2) a ako je stanovené v Globálne harmonizovanom systéme klasifikácie (GHS) (1). Táto stratégia testovania zahŕňa vykonávanie testov *in vitro* s cieľom zistiť poleptanie kože (ako je opísané v tejto metóde) a dráždivosť pre kožu pred zvážením testovania na živých zvieratách.

▼B

1.2. VYMEDZENIE POJMOV

Poleptanie kože *in vivo:* je vznik nevratného poškodenia kože: najmä viditeľná nekróza postihujúca epidermu a zasahujúca do dermy, ktorá nastane do štyroch hodín po aplikácii testovanej látky. Typickými reakciami na poleptanie sú vredy, krvácanie, krvavé chrasty a na konci štrnásťdňového pozorovania strata farby v dôsledku vyblednutia kože, úplné ložiská alopécie a jazvy. Na vyhodnotenie problematických lézií by sa malo uvažovať histopatológii.

Životaschopnosť buniek: parameter, ktorým sa meria celková aktivita bunkovej populácie (napr. schopnosť bunkových mitochondriálnych dehydrogenáz redukovať vitálne farbivo MMT) a ktorý v závislosti od posledného merania a od použitom usporiadaní testu je v korelačnom vzťahu s celkovým počtom buniek a/alebo s ich vitalitou.

1.3. REFERENČNÉ LATKY

Tabuľka 1

Referenčné chemické látky

Názov	Číslo EINECS	Číslo CAS	
propán-l,2-diamín	201-155-9	78-90-0	silno žieravý
kyselina akrylová	201-177-9	79-10-7	silno žieravá
2-terc- butylfenol	201-807-2	88-18-6	žieravý
hydroxid draselný (10 %)	215-181-3	1310-58-3	žieravý
kyselina sírová (10 %)	231-639-5	7664-93-9	žieravá
kyselina oktánová (kaprylová)	204-677-5	124-07-02	žieravá
4H-1,2,4-triazoM-ylamín	209-533-5	584-13-4	nežieravý
eugenol	202-589-1	97-53-0	nežieravý
fenetylbromid	203-130-8	103-63-9	nežieravý
tetrachlóretylén	204-825-9	27-18-4	nežieravý
kyselina izostearová	250-178-0	30399-84-9	nežieravá
4-(metylsulfanyl)benzaldehyd	222-365-7	3446-89-7	nežieravý

Väčšina z uvedených chemických látok je prevzatá zo zoznamu chemických látok vybratých pre medzinárodnú validačnú štúdiu ECVAM (4). Ich výber sa zakladá na týchto kritériách:

i) rovnaký počet žieravých a nežieravých látok;

ii) komerčne dostupné látky, ktoré sa vzťahujú na väčšinu relevantných tried chemických látok;

iii) zahrnutie silno žieravých a menej žieravých látok, aby sa umožnilo rozlíšenie na základe možného žieravého účinku;

▼B

iv) výber chemických látok, s ktorými možno manipulovať v laboratóriu bez vážnych nebezpečenstiev, iných ako je žieravosť.

1.4. PODSTATA TESTOVACEJ METÓDY

Testovaný materiál sa lokálne aplikuje na trojrozmerný model ľudskej kože pozostávajúci aspoň z rekonštruovanej epidermy s funkčnou rohovitou vrstvou *(stratum corneum)*. Žieravé materiály sa identifikujú na základe schopnosti spôsobiť pri špecifikovanej expozičnej dobe pokles životaschopnosti buniek [stanovený napríklad pomocou skúšky redukcie MTT (15)] pod definovanú prahovú úroveň. Podstata skúšky pomocou modelu ľudskej kože sa zakladá na hypotéze, že žieravé chemikálie sú tie, ktoré sú schopné preniknúť rohovitou vrstvou *(stratum corneum)* difúziou alebo eróziou a sú cytotoxické pre bunky v hlbších bunkových vrstvách.

1.4.1. **Postup**

1.4.1.1. *Modely ľudskej kože*

Modely ľudskej kože možno vyrobiť alebo získať komerčne (napr. modely EpiDerm™ a EPISKIN™) (16), (17), (18), (19) alebo ich možno pripraviť či vyrobiť v testovacom laboratóriu (20), (21). Uznáva sa, že využitie ľudskej kože podlieha vnútroštátnym a medzinárodným etickým zreteľom a podmienkam. Každý nový model by mal byť validovaný (aspoň v rozsahu uvedenom v 1.4.1.1.2). Modely ľudskej kože použité pre tento test musia spĺňať tieto podmienky:

1.4.1.1.1. Všeobecné podmienky modelu:

Na zostavenie epitelu by sa mali použiť ľudské keratinocyty. Pod funkčnou rohovitou vrstvou *(stratum corneum)* by malo byť viac vrstiev životaschopných epitelových buniek. Model kože môže mať takisto ako zložku stromálnu vrstvu. Rohovitá vrstva *(stratum corneum)* by mala byť viacvrstvová a s potrebným profilom lipidov, aby sa umožnila funkcia robustnej bariéry odolávajúcej rýchlemu prenikaniu cytotoxických markerov. Izolačné vlastnosti modelu by mali zabrániť prenikaniu materiálu okolo *stratum corneum* do životaschopného tkaniva. Preniknutie testovaných chemických látok okolo *stratum corneum* povedie k chybnému modelovaniu expozície kože. Model kože by nemal byť kontaminovaný baktériami (vrátane mykoplazmy) ani hubami.

1.4.1.1.2 Podmienky funkčného modelu:

Rozsah životaschopnosti sa obyčajne stanovuje na základe MTT alebo iných metabolicky premenených vitálnych farbív. V týchto prípadoch by optická hustota (optical density – OD) extrahovaného (solubilizovaného) farbiva negatívneho kontrolného tkaniva mala byť aspoň 20-násobne vyššia ako OD samotného extrakčného rozpúšťadla [pozri prehľad v (22)]. Negatívne kontrolné tkanivo by malo byť stabilné v kultúre (malo by viesť k podobným výsledkom merania životaschopnosti) počas expozičnej doby testu. *Stratum corneum* musí byť dostatočne robustné, aby odolalo rýchlemu prieniku určitých cytotoxických markerových chemikálií (napríklad 1 % Triton X-100). Túto vlastnosť možno odhadnúť pomocou expozičnej doby potrebnej na zníženie životaschopnosti buniek o 50 % (ET_{50}) (napr. pri modeloch EpiDerm™ a EPISKIN™ je to > 2 hod.). Tkanivo by malo byť preukázateľne schopné reprodukovateľnosti v čase a prednostne aj medzilaboratórne. Okrem toho by malo umožniť predikciu potenciálu žieravosti referenčných chemických látok (pozri tabuľku 1), ak sa používa vo zvolenom testovacom protokole.

▼B

1.4.1.2. *Aplikácia testovaných a kontrolných látok*

Pre každý experiment (expozičný čas), vrátane kontrolných, sa použijú dve repliky tkaniva. Pri tekutých materiáloch sa musí aplikovať dostatočné množstvo testovanej látky, aby sa povrch kože rovnomerne pokryl: malo by sa použiť najmenej 25 µl/cm2. Pri tuhých materiáloch sa musí aplikovať dostatočné množstvo testovanej látky, aby koža bola rovnomerne pokrytá, a testovaná látka by mala byť zvlhčená deionizovanou alebo destilovanou vodou, aby bol zaistený dobrý styk s kožou. Tuhé materiály by sa mali podľa potreby pred aplikáciou zomlieť na prášok. Metóda aplikácie by mala byť pre testovanú látku vhodná (pozri napr. odkaz 5). Na konci expozičnej doby sa testovaný materiál musí dôkladne zmyť z povrchu kože pomocou vhodného pufra alebo 0,9 % roztokom NaCl.

Pre každú štúdiu by sa mali súbežne vykonať pozitívne a negatívne kontroly na zabezpečenie dostatočnej funkčnosti daného experimentálneho modelu. Odporúčanými látkami pre pozitívnu kontrolu sú ľadová kyselina octová alebo 8N KOH. Odporúčanými látkami pre negatívnu kontrolu sú 0,9 % roztok NaCl alebo voda.

1.4.1.3. *Meranie životaschopnosti buniek*

Na meranie životaschopnosti buniek sa môžu používať len validované kvantitatívne metódy. Ďalej, miera životaschopnosti musí byť zlučiteľná s využívaním v trojrozmernom modeli tkaniva. Nešpecifické viazanie farbiva nesmie interferovať s meraním životaschopnosti. Preto nie sú vhodné farbivá viažuce bielkoviny a farbivá nepodliehajúce metabolickej konverzii (napr. neutrálna červeň). Najčastejšie používanou skúškou je stanovenie redukcie MTT [3-(4,5-dimetyltiazol-2yl)-2,5-difenyltetrazólium bromid, tiazolylová modrá: číslo EINECS 206-069-5, číslo CAS 298-93-1)], pre ktorú bolo preukázané, že poskytuje presné a reprodukovateľné výsledky (5), ale možno použiť aj iné. Vzorka kože sa umiestni do roztoku MTT s vhodnou koncentráciou (napr. 0,3 až 1 mg/ml) a inkubuje sa pri vhodnej teplote počas 3 hodín. Pomocou rozpúšťadla (izopropanol) sa potom extrahuje zrazenina modrého formazánového produktu, pričom koncentrácia formazánu sa meria na základe stanovenia OD pri vlnovej dĺžke medzi 540 a 595 nm.

Chemický účinok testovaného materiálu na vitálne farbivo môže imitovať účinok bunkového metabolizmu, čo vedie k nesprávnemu odhadu životaschopnosti. K tomu preukázateľne dochádza, keď sa testovaný materiál úplne neopláchne z kože (9). Ak testovaný materiál pôsobí priamo na vitálne farbivo, musia sa použiť ďalšie kontroly, aby zistilo, či testované látky neinterferujú s meraním životaschopnosti, a prípadné výsledky korigovať (9), (23).

2. **ÚDAJE**

Pre každé tkanivo je potrebné do tabuľky zaznamenať hodnoty OD a vypočítaný percentuálny podiel životaschopnosti buniek pre testovaný materiál a pre pozitívne aj negatívne kontroly, vrátane údajov o duplicitných alebo opakovaných experimentoch, a prípadne ich stredné a individuálne hodnoty.

▼B

2.1. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Hodnoty OD namerané pre každú testovaciu vzorku sa môžu použiť na výpočet percentuálneho podielu životaschopnosti vzhľadom na výsledok negatívnej kontroly, ktorý je dohodou stanovený na úroveň 100 %. Referenčná prahová hodnota percentuálneho podielu životaschopnosti buniek umožňujúca rozlišovať žieravé a nežieravé testované materiály (alebo rozlišovať medzi rôznymi triedami žieravých), alebo štatistické postupy použité na vyhodnotenie výsledkov a identifikáciu žieravých materiálov, musia byť jasne definované, zdokumentované, a musí sa preukázať ich vhodnosť. Vo všeobecnosti sa tieto referenčné prahové hodnoty určujú počas optimalizácie testu, ich testovaním predvalidačnej fázy a potvrdzujú sa validačnou štúdiou. Predikcia žieravosti je v spojení s modelom EpiDerm™ daná napríklad takto (9):

Testovaná látka sa pokladá za žieravú pre kožu:

i) ak po 3 minútach expozície je životaschopnosť nižšia ako 50 %, alebo

ii) ak po 3 minútach expozície je životaschopnosť vyššia ako 50 % alebo sa rovná 50 % a životaschopnosť po 1 hodine expozície je nižšia ako 15 %.

Testovaná látka sa pokladá za látku nežieravú pre kožu:

i) ak po 3 minútach expozície je životaschopnosť vyššia ako 50 % alebo sa rovná 50 % a životaschopnosť po 1 hodine expozície je vyššia ako 15 % alebo sa rovná 15 %.

3. **SPRÁVY**

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná a kontrolná látka:

— chemický názov (chemické názvy), ako napríklad názov podľa IUPAC alebo CAS a číslo CAS, ak je známe,

— čistota a zloženie látky alebo prípravku (v hmotnostných percentách),

— fyzikálno-chemické vlastnosti ako napríklad fyzikálny stav, pH, stabilita, rozpustnosť vo vode, relevantné pre vykonanie štúdie,

— prípadná úprava testovaných/kontrolných látok pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie),

— stabilita, ak je známa.

Zdôvodnenie modelu kože a použitého protokolu.

Testovacie podmienky:

— použitý bunkový systém,

— údaje o kalibrácii zariadenia použitého na meranie životaschopnosti buniek (napr. spektrofotometer),

▼B

— úplné podkladové údaje pre konkrétny použitý model kože vrátane jeho validity,

— podrobnosti o použitom testovacom postupe,

— použité testovacie dávky,

— opis všetkých modifikácií testovacieho postupu,

— odkaz na minulé údaje o danom modeli,

— opis použitých hodnotiacich kritérií.

Výsledky:

— údaje z individuálnych testovacích vzoriek, spracované v podobe tabuľky,

— opis ďalších pozorovaných účinkov.

Rozbor výsledkov.

Záver

4. **ODKAZY NA LITERATÚRU**

(1) OECD (2001) Harmonised Integrated Classification System for Human Health and Environmental Hazards of Chemical Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment Number 33. ENV/JM/MONO(2001)6, Paris. http://www.olis.oecd.org/olis/2001doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono(2001)6.

(2) Testing Method B.4. Acute Toxicity: Dermal Irritation/-Corrosion.

(3) Botham, P.A., Chamberlain, M., Barratt, M.D., Curren, R.D., Esdaile, D.J., Gardner, J.R., Gordon, V.C., Hildebrand, B., Lewis, R.W., Liebsch, M., Logemann, P., Osborne, R., Ponec, M., Regnier, J.F., Steiling, W., Walker, A.P., and Balls, M. (1995). A prevalidation study on *in vitro* skin corrosivity testing. The report recommendations of ECVAM Workshop 6 ATLA 23, 219 – 255.

(4) Barratt, M.D., Brantom, P.G., Fentem, J.H., Gerner, I., Walker, A.P., and Worth, A.P. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 1. Selection and distribution of the test chemicals. Toxic. In Vitro 12, 471 – 482.

(5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998). The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxic. In Vitro 12, 483 – 524.*

(6) OECD (1996). Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods, 62 pp.

(7) Balls, M., Blaauboer, B.J., Fentem, J.H., Bruner, L., Combes, R.D., Ekwall, B., Fielder, R.J., Guillouzo, A., Lewis, R.W., Lovell, D.P., Reinhardt, C.A., Repetto, G., Sladowski, D., Spielmann, H., and Zucco, F. (1995). Practical aspects of the validation of toxicity test procedures. Test report and recommendations of ECVAM workshops. ATLA 23, 129 – 147.

(8) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (1997). Validation and Regulatory Acceptance of Toxicological Test Methods. NIH Publication No. 97-3981. National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/guidelines/validate.pdf

▼B

(9) Liebsch, M., Traue, D., Barrabas, C, Spielmann, H., Uphill, P., Wilkins, S., McPherson, J.P., Wiemann, C, Kaufmann, T., Remmele, M. and Holzhutter, H.G. (2000). The ECVAM prevalidation study on the use of EpiDerm for skin Corrosivity testing. ATLA 28, pp. 371 – 401.

(10) ECVAM (1998). ECVAM News & Views. ATLA 26, 275 – 280.

(11) ECVAM (2000). ECVAM News & Views. ATLA 28, 365 – 67.

(12) ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods). (2002). ICCVAM evaluation of EpiDerm™, EPISKIN™ (EPI-200), and the Rat Skin Transcutaneous Electrical Resistance (TER) assay: In Vitro test methods for assessing dermal corrosivity potential of chemicals. NTH Publication No. 02-4502. National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, USA. http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/epiddocs/epis_brd.pdf

(13) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro Skin Corrosion Test Guideline Proposal, Berlin, 1st - 2nd November 2001, Secretariat's Final Summary Report, 27th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat

(14) Worth AP, Fentem JH, Balls M, Botham PA, Curren RD, Earl LK, Esdaile DJ, Liebsch M (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26: 709 – 720.

(15) Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity asssays. J.Immunol. Meth. 65, 55 – 63.

(16) Cannon, C.L., Neal, P.J., Southee, J.A., Kubilus, J., and Klausner, M., 1994. New epidermal model for dermal irritancy testing. Toxic. In Vitro 8, 889 – 891.

(17) Ponec, M., Boelsma, E., Weerheim, A., Mulder, A., Boutwstra, J., and Mommaas, M., 2000. Lipid and ultrastructural characterization of reconstructed skin models. International Journal of Pharmaceutics. 203, 211 – 225.

(18) Tinois E, Gaetani Q, Gayraud B, Dupont D, Rougier A, Pouradier DX (1994). The Episkin model: Successful reconstruction of human epidermis in vitro. In In vitro Skin Toxicology. Edited by A Rougier, AM Goldberg and HI Maibach: 133 – 140

(19) Tinois E, Tiollier J, Gaucherand M, Dumas H, Tardy M, Thivolet J (1991). In vitro and post-transplantation differentiation of human keratinocytes grown on the human type IV collagen film of a bilayered dermal substitute. Experimental Cell Research 193: 310 – 319

(20) Parentau, N.L., Bilbo, P., Molte, C.J., Mason, V.S., and Rosenberg, H. (1992). The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function. Cytotechnology 9, 163 – 171.

(21) Wilkins, L.M., Watson, S.R., Prosky, S.J., Meunier, S.F., Parentau, N.L. (1994). Development of a bilayered living skin construct for clinical applications. Biotechnology and Bioengineering 43/8, 747 – 756.

▼B

(22) Marshall, N.J., Goodwin, C.J., Holt, S.J. (1995). A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. Growth Regulation 5, 69 – 84.

(23) Fentem, J.H., Briggs, D., Chesne', C, Elliot, G.R., Harbell, J.W., Heylings, J.R., Portes, P., Rouget, R., and van de Sandt, J.J.M., and Botham, P.A. (2001). A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: results and evaluation by the Management Team. Toxic. In Vitro 15, 57 – 93.

▼B

B.41. TEST FOTOTOXICITY 3T3 NRU *IN VITRO*

1. METÓDA

Táto metóda je ekvivalentná OECD TG 432 (2004).

1.1. ÚVOD

Fototoxicita sa definuje ako toxická odozva na látku aplikovanú na telo, ktorá je buď vyvolaná, alebo zvýšená (je zjavná pri nižších úrovniach dávok) po následnej expozícii svetlu, alebo ktorá je vyvolaná ožiarením kože po systémovom podaní chemickej látky.

Test fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* sa používa na identifikáciu fototoxického potenciálu testovanej látky vyvolaného chemickou látkou excitovanou po expozícii svetlu. Týmto testom sa vyhodnocuje fotocytotoxicita pomocou relatívneho zníženia životaschopnosti buniek exponovaných účinkom chemickej látky jednak v prítomnosti a jednak v neprítomnosti svetla. Látky identifikované týmto testom sú pravdepodobne fototoxické *in vivo* po systémovej aplikácii a distribúcii do kože, alebo po lokálnej aplikácii.

Uvádza sa, že mnohé druhy chemických látok indukujú fototoxické účinky (1), (2), (3), (4). Spoločnou črtou je ich schopnosť absorbovať svetelnú energiu slnečného svetla. Podľa prvého fotochemického zákona (Grotthaus-Draperov zákon) je fotoreakcia podmienená dostatočnou absorpciou svetelných kvánt. Pred zvažovaním biologického testovania sa preto musí stanoviť absorpčné spektrum testovanej chemickej látky v oblasti U V/viditeľného svetla v súlade s usmernením OECD Test Guideline 101. Vychádza sa z toho, že ak je mólový extinkčný/absorpčný koeficient nižší ako 10 litrov × mol^{-1} × cm^{-1}, daná chemická látka pravdepodobne nie je fotoreaktívna. Takúto chemickú látku nie je potrebné testovať testom fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* ani iným biologickým testom na nepriaznivé fotochemické účinky (1), (5). Pozri aj prílohu 1.

Nedávno boli vyhodnotené spoľahlivosť a význam testu fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* (6), (7), (8), (9). Ukázalo sa, že test fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* je prediktívny, pokiaľ ide o akútne fototoxické účinky na zvieratá a ľudí *in vivo*. Test nie je určený na predikciu ďalších nepriaznivých účinkov, ktoré môžu vzniknúť zo spoločného pôsobenia chemickej látky a svetla, napr. neumožňuje skúmať fotogenotoxicitu, fotoalergiu ani fotokarcinogenitu, ani neumožňuje posúdiť fototoxický potenciál. Okrem toho tento test nie je určený na riešenie nepriamych mechanizmov fototoxicity ani účinkov metabolitov testovanej látky alebo účinkov zmesí.

Keďže použitie metabolizujúcich systémov je všeobecnou požiadavkou pri všetkých testoch *in vitro* určených na predikciu genotoxického a karcinogénneho potenciálu, v prípade fototoxikológie existujú iba zriedkavé prípady, keď je potrebná metabolická transformácia na to, aby chemická látka pôsobila ako fototoxín *in vivo* alebo *in vitro*. Nepokladá sa teda za potrebné ani za vedecky opodstatnené, aby sa tento test vykonával s použitím systému metabolickej aktivácie.

▼B

1.2. VYMEDZENIE POJMOV

Intenzita ožiarenia: intenzita ultrafialového (UV) alebo viditeľného svetla dopadajúceho na povrch, meraná v jednotkách W/m^2 alebo mW/cm^2.

Dávka svetla: množstvo (= intenzita × čas) ultrafialového (UV) alebo viditeľného žiarenia dopadajúceho na povrch a vyjadreného v jouloch (= W × s) na plochu povrchu, napr. J/m^2 alebo J/cm^2.

Vlnové pásma UV svetla: označenia odporúčané CIE (Medzinárodná komisia pre osvetlenie – Commission Internationale de L'Eclairage) sú tieto: UVA (315 – 400 nm), UVB (280 – 315 nm) a UVC (100 – 280 nm). Používajú sa aj iné označenia; rozlíšenie medzi UVB a UVA sa často kladie na 320nm a UVA možno rozdeliť na UV-A1 a UV-A2 s hranicou približne na 340 nm.

Životaschopnosť buniek: parameter, ktorým sa meria celková aktivita bunkovej populácie (napr. absorbovanie vitálneho farbiva neutrálna červeň do bunkových lyzozómov), ktorý v závislosti od posledného merania a použitej testovacej metódy je v korelačnom vzťahu s celkovým počtom buniek a/alebo ich vitalitou.

Relatívna životaschopnosť buniek: životaschopnosť buniek vyjadrená vo vzťahu k rozpúšťadlovým (negatívnym) kontrolným vzorkám, ktoré boli odoberané počas celého testovacieho postupu (buď +Irr, alebo –Irr), ale bez aplikovania testovanej chemickej látky.

PIF ***(Photo-Irritation-Factor – koeficient svetelnej dráždivosti):*** koeficient vytvorený porovnaním dvoch rovnako účinných cytotoxických koncentrácií (IC_{50}) testovanej chemickej látky získanej za neprítomnosti (-Irr) a za prítomnosti (+Irr) necytotoxického ožiarenia UV A/vis svetlom.

IC_{50}: koncentrácia testovanej chemickej látky, ktorou sa životaschopnosť bunky zníži o 50 %.

MPE *(Mean-Photo-Effect* – **stredný svetelný účinok):** veličina odvodená z matematickej analýzy priebehu kriviek odozvy na koncentráciu, získaných za neprítomnosti (–Irr) a za prítomnosti (+Irr) necytotoxického žiarenia UV A/vis svetlom.

Fototoxicita: akútna toxická odozva, ktorá je vyvolaná po prvej expozícii kože určitým chemikáliám a následnej expozícii svetlu, alebo ktorá je podobne vyvolaná ožiarením kože po systémovom podávaní chemickej látky.

1.3. PODSTATA TESTOVACEJ METÓDY

Test fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* je založený na porovnaní cytotoxicity chemickej látky pri testovaní s expozíciou necytotoxickej dávky simulovaného slnečného svetla a bez tejto expozície. Cytotoxicita je v tomto teste vyjadrená ako koncentračne závislé zníženie absorpcie vitálneho farbiva neutrálna červeň (NR), meraná 24 hodín po pôsobení testovanej chemickej látky a ožiarenia (10). NR je slabé katiónové farbivo, ktoré ľahko preniká cez bunkové membrány nedifúznym spôsobom, pričom sa akumuluje vnútrobunkovo v lyzozómoch. Zmeny bunkového povrchu citlivej lyzozomálnej membrány vedú k lámavosti lyzozómov a iným zmenám, ktoré sa postupne stávajú nevratnými. Také zmeny vyvolané pôsobením xenobiotík vedú k zníženiu absorpcie a viazaniu NR. Preto je možné rozlišovať medzi životaschopnými a poškodenými alebo mŕtvymi bunkami, čo je základom tohto testu.

▼B

Bunky Balb/c 3T3 sa kultivujú počas 24 hodín, aby sa vytvorili monomolekulové vrstvy. Dve 96-jamkové doštičky na jednu testovanú chemickú látku sa 1 hodinu predinkubujú ôsmimi rôznymi koncentráciami testovanej látky. Potom sa jedna z týchto dvoch doštičiek exponuje najvyššej necytotoxickej dávke ožiarenia, kým druhá doštička sa udržiava v tme. V obidvoch doštičkách sa potom pôsobiace médium nahradí kultivačným médiom a po ďalších 24 hodinách inkubácie sa stanoví životaschopnosť buniek pomocou absorpcie neutrálnej červene. Životaschopnosť buniek sa vyjadruje ako percentuálny podiel vzhľadom na výsledok neupravenej rozpúšťadlovej kontrolnej vzorky a vypočíta sa pre každú z testovacích koncentrácií. Na predikciu fototoxického potenciálu sa porovnajú odozvy koncentrácií získané pri ožiarení a bez ožiarenia, zvyčajne na úrovni IC_{50}, t. j. pri koncentrácii, ktorou sa znižuje životaschopnosť buniek na 50 % v porovnaní s neupravovanými kontrolnými vzorkami.

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1 **Prípravne práce**

1.4.1.1. *Bunky*

Pri validačnej štúdii sa použila permanentná myšia fibroplastová bunková línia Balb/c 3T3, klon 31, buď z banky kultúr amerického typu (ATCC – American Type Culture Collection), Manassas, Vigínia, USA, alebo z európskej banky bunkových kultúr (ECACC – European Collection of Cell Cultures), Salisbury, grófstvo Wiltshire, Spojené Kráľovstvo, a preto sa odporúča získať bunky z riadne kvalifikovaného depozitára buniek. Pri tom istom testovacom procese sa môžu použiť iné bunky alebo bunkové línie, ak sú kultivačné podmienky prispôsobené špecifickým potrebám buniek, ale musí byť preukázaná ich rovnocennosť.

Bunky by sa mali pravidelne kontrolovať, či nedošlo k mykoplazmovej kontaminácii a použiť iba vtedy, ak sa kontaminácia nezistí (11).

Je dôležité pravidelne kontrolovať citlivosť buniek na UV podľa postupu kontroly kvality opísanom v tejto metóde. Keďže citlivosť buniek na UVA môže s počtom pasáží stúpať, mali by sa použiť bunky Balb/c 3T3 s najnižším dosiahnuteľným počtom pasáží, najlepšie menej ako 100. (Pozri 1.4.2.2.2. a prílohu 2.)

1.4.1.2. *Médiá a kultivačné podmienky*

Na rutinné pasážovanie buniek a počas testovacieho postupu by sa mali používať vhodné kultivačné médiá a inkubačné podmienky, napr. pre bunky Balb/c 3T3 sú to DMEM (Dulbeccova modifikácia Eagleovho média – Dulbecco's Modified Eagle's Medium) obohatenú 10 % sérom z novonarodeného teľaťa, 4 mM glutamínom, penicilínom (100 IU), a streptomycínom (100 μg/ml), a o inkubáciu v zvlhčenom prostredí pri 37 °C s 5 – 7,5 % CO_2 v závislosti od použitého pufra (pozri časť 1.4.1.4 druhý pododsek). Osobitne dôležité je kultivačnými podmienkami bunky zabezpečiť, aby bunkový časový cyklus bol v rámci bežného doterajšieho rozsahu pre použité bunky alebo bunkovú líniu.

1.4.1.3 *Príprava kultúr*

Bunky zo zmrazených kmeňových kultúr sa nasadia do kultivačného média v primeranej hustote a pred použitím v teste fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* sa najmenej raz subkultivujú.

▼B

Bunky používané pri teste fototoxicity sa nasadia do kultivačného média v primeranej hustote tak, aby do konca testu nedošlo ku konfluencii kultúr, t. j. do okamihu, keď sa po 48 hodinách od nasadenia stanovuje životaschopnosť buniek. V prípade buniek Balb/c 3T3, ktoré sa pestujú v 96-jamkových doštičkách, sa odporúča hustota nasadenia 1×10^4 buniek na jamku.

Pre každú testovanú chemickú látku sa bunky rovnakým spôsobom nasadia do dvoch samostatných 96-jamkových doštičiek, ktoré sa potom súbežne podrobia celému testovaciemu postupu za rovnakých kultivačných podmienok, s výnimkou času, keď sa jedna z doštičiek ožiari (+Irr) a druhá sa ponechá v tme (–Irr).

1.4.1.4 *Príprava testovanej látky*

Testované látky musia byť tesne pred použitím čerstvo pripravené, pokiaľ sa však údajmi nepreukáže ich stabilita pri skladovaní. Odporúča sa, aby sa každá manipulácia s chemikáliami a počiatočné ošetrenie buniek vykonávali za takých svetelných podmienok, ktoré by pred ožiarením zabránili fotoaktivácii alebo degradácii testovanej látky.

Testované chemické látky sa rozpustia v pufrovaných soľných roztokoch, napr. v Earlovom rovnovážnom soľnom roztoku (EBSS), alebo v iných fyziologicky rovnovážnych pufrových roztokoch, ktoré nesmú obsahovať bielkovinové zložky, zložky absorbujúce svetlo, (napr. pH indikátory farby a vitamíny), aby sa predišlo interferencii počas ožarovania. Keďže bunky sa počas ožarovania držia približne 50 minút mimo inkubátora v atmosfére obsahujúcej CO_2, je potrebné dbať na to, aby sa zabránilo alkalizácii. Ak sa používajú slabé pufre ako napr. EBSS, možno to dosiahnuť inkubovaním buniek v atmosfére obsahujúcej 7,5 % CO_2. Ak sú bunky inkubované v atmosfére obsahujúcej iba 5 % CO_2, mal by sa zvoliť silnejší pufer.

Testované chemické látky s obmedzenou rozpustnosťou vo vode by mali byť rozpustené vo vhodnom rozpúšťadle. Ak sa použije rozpúšťadlo, musí byť prítomné v konštantnom objeme vo všetkých kultúrach, t. j. v negatívnych (rozpúšťadlových) kontrolných vzorkách, ako aj vo všetkých koncentráciách testovanej chemickej látky a pri tejto koncentrácii musí byť necytotoxické. Koncentrácie testovanej chemickej látky by sa mali zvoliť tak, aby sa zabránilo zrážaniu alebo zakaleniu roztoku.

Odporúčanými rozpúšťadlami sú dimetylsulfoxid (DMSO) a etanol (ETOH). Vhodné môžu byť aj iné rozpúšťadlá s nízkou cytotoxicitou. Všetky rozpúšťadlá by sa pred použitím mali posúdiť z hľadiska ich špecifických vlastností, napr. reakcie s testovanou chemickou látkou, zmierňovania fototoxického účinku, vlastnosti v súvislosti so zachytávaním radikálov a/alebo chemickej stability v rozpúšťadle.

Rozpúšťanie sa môže uľahčiť vírivým miešaním a/alebo pôsobením ultrazvuku, a/alebo zahriatím na príslušné teploty, pokiaľ sa to nedotkne stability testovanej chemickej látky.

▼B

1.4.1.5 *Podmienky ožarovania*

1.4.1.5.1. Zdroj svetla

Pri testovaní fototoxicity je rozhodujúcim faktorom výber vhodného svetelného zdroja a filtrov. Svetlo v pásme UVA a vo viditeľnom pásme sa zvyčajne spája s fototoxickými reakciami *in vivo* (3), (12), zatiaľ čo žiarenie v pásme UVB je menej relevantné, ale je veľmi cytotoxické; cytotoxicita sa zvyšuje 1 000-krát pri posune vlnovej dĺžky z 313 na 280 nm (13). Kritériá výberu vhodného svetelného zdroja musia zahŕňať požiadavku, aby svetelný zdroj vysielal svetlo s vlnovými dĺžkami, ktoré testovaná chemická látka absorbuje (absorpčné spektrum) a aby dávka svetla (dosiahnuteľná v priebehu primeraného expozičného času) bola dostatočná na detekciu známych fotocytotoxických chemických látok. Ďalej, použité vlnové dĺžky a dávky by nemali mať neprimerane zhubné účinky na testovací systém, napr. emisiou tepla (infračervená oblasť).

Za optimálny zdroj umelého svetla sa pokladá simulácia slnečného svetla pomocou solárnych simulátorov. Distribúcia ožarovacieho výkonu filtrovaného solárneho simulátora by mala byť blízka vonkajšiemu dennému svetlu uvedenému v (14). V solárnych simulátoroch sa používajú jednak xenónové výbojky, a jednak vysokotlakové ortuťovo-kovové halogénové výbojky (15). Druhá z nich má tú výhodu, že vyžaruje menej tepla a je lacnejšia, ale slnečné svetlo napodobňuje menej dokonale než xenónová výbojka. Pretože všetky solárne simulátory vyžarujú významné množstvá UVB žiarenia, mali by byť vhodným spôsobom filtrované s cieľom stlmiť vysoko cytotoxické vlnové dĺžky UVB. Vzhľadom na to, že bunkové kultúry plastových materiálov obsahujú UV stabilizátory, spektrum by sa malo merať pomocou rovnakého druhu veka 96-jamkovej doštičky, ako sa bude používať pri skúške. Bez ohľadu na opatrenia prijaté na stlmenie častí spektra pomocou filtrovania alebo filtračnými účinkami zariadenia, ktorým sa nemožno vyhnúť, spektrum zaznamenané pod týmito filtrami by sa nemalo líšiť od normalizovaného denného svetla vo vonkajšom prostredí (14). Príklad distribúcie spektrálneho vyžarovania filtrovaného solárneho simulátora použitého vo validačnej štúdii testu fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* sa uvádza v literatúre (8), (16). Pozri aj prílohu 2 obrázok 1.

1.4.1.5.2. Dozimetria

Intenzita svetla (intenzita ožarovania) by sa mala pravidelne kontrolovať pred každým testom fototoxicity s použitím vhodného širokopásmového UV-merača. Táto intenzita by sa mala merať cez rovnaký druh veka 96-jamkovej doštičky, aký sa použije počas skúšky. Tento UV-merač musí byť kalibrovaný na zdroj. Funkčnosť UV-merača by sa mala kontrolovať a na tento účel sa odporúča použiť druhý, referenčný UV-merač rovnakého druhu s totožnou kalibráciou. V ideálnom prípade by sa mal v dlhších časových odstupoch použiť spektrorádiometer na zmeranie spektrálneho vyžarovania filtrovaného svetelného zdroja a na kontrolu kalibrácie širokopásmového UV-merača.

Dávka 5 J/cm^2 (meraná v pásme UVA) bola stanovená ako necytotoxická pre bunky Balb/c 3T3 a ako dostatočne silná na excitáciu chemických látok tak, aby vyvolávali fototoxické reakcie (6), (17), napr. na dosiahnutie 5 J/cm^2 počas 50 minút bolo vyžarovanie upravené na hodnotu 1,7 mW/cm^2. Pozri prílohu 2 obrázok 2. Ak sa používa iná bunková línia alebo odlišný svetelný zdroj, je možné, že dávka vyžarovania sa bude musieť kalibrovať tak, aby sa mohol zvoliť režim dávkovania, ktorý nebude mať zhubný účinok na bunky, ale bude dostatočný na excitovanie štandardných fototoxínov. Čas svetelnej expozície sa vypočíta týmto spôsobom:

▼B

$$\text{t (min)} = \frac{\text{dávka ožiarenia } (J/cm^2) \times 1000}{\text{ožiarenie } (mW/cm^2) \times 60} \qquad (1 \text{ J} = 1 \text{ Wsec})$$

1.4.2. **Testovacie podmienky**

1.4.2.1. *Koncentrácie testovanej látky*

Rozmedzia koncentrácií chemickej látky testovanej so svetlom (+Irr) a bez svetla (–Irr) by mali byť vhodne stanovené v rámci experimentov na zistenie rozsahu dávky. Môže byť užitočné posúdiť rozpustnosť na začiatku a po 60 minútach (alebo podľa toho, aký čas úpravy sa používa), keďže rozpustnosť sa môže meniť v čase alebo v priebehu expozície. Hodnota pH bunkových kultúr s pridanou testovanou chemickou látkou mala byť v rozsahu 6,5 – 7,8, aby bola vylúčená toxicita vyvolaná nevhodnými kultivačnými podmienkami alebo vysoko kyslými či zásaditými chemickými látkami.

Najvyššia koncentrácia testovanej látky by sa mala byť zlučiteľná s fyziologickými testovacími podmienkami, napr. mal by byť vylúčený osmotický stres a stres z pH. V závislosti od testovanej chemickej látky môže byť potrebné vziať do úvahy ďalšie fyzikálno-chemické vlastnosti ako sú faktory obmedzujúce najvyššiu testovaciu koncentráciu. V prípade relatívne nerozpustných látok, ktoré nie sú toxické pri koncentráciách až do bodu nasýtenia, mala by sa testovať najvyššia dosiahnuteľná koncentrácia. Vo všeobecnosti by sa malo vylúčiť zrážanie testovanej chemickej látky pri akýchkoľvek testovacích koncentráciách. Maximálna koncentrácia testovanej látky by nemala presiahnuť 1 000 μg/ml; osmolarita by nemala presiahnuť 10 mmol. Mali by sa použiť geometrické rady riedenia 8 koncentrácií testovanej látky s konštantným faktorom riedenia (pozri časť 2.1 druhý odsek).

Ak existujú údaje (z experimentu na zistenie rozsahu), že testovaná chemická látka nie je cytotoxická až do limitnej koncentrácie pri pokuse v tme (–Irr), ale je vysoko cytotoxická pri ožiarení (+Irr), rozsahy koncentrácií, ktoré sa musia zvoliť na pokus (+Irr), sa môžu líšiť od rozsahov zvolených pre (–Irr) pokus, aby sa splnila požiadavka dostatočnej kvality údajov.

1.4.2.2. *Kontroly*

1.4.2.2.1. Radiačná citlivosť buniek, zistenie doterajších údajov:

Citlivosť buniek na svetelný zdroj by sa mala pravidelne kontrolovať (približne každý piata pasáž) pomocou posúdenia ich životaschopnosti po expozícii narastajúcim dávkam ožiarenia. Pri tomto posudzovaní by sa malo použiť niekoľko dávok ožiarenia vrátane úrovní podstatne vyšších, ako sú úrovne používané pri teste fototoxicity 3T3 NRU. Tieto dávky sú najľahšie stanoviteľné meraniami UV častí svetelného zdroja. Bunky sa nasadia pri hustote používanej pri teste fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* a ožarujú sa nasledujúci deň. Životaschopnosť bunky sa potom stanoví o deň neskôr s použitím absorpcie neutrálnej červene. Malo by preukázať, že výsledná najvyššia necytotoxická dávka (napr. v rámci validačnej štúdie: 5 J/cm^2 [UVA]) bola dostatočná na správnu klasifikáciu referenčných chemických látok (tabuľka 1).

▼B

1.4.2.2.2. Radiačná citlivosť, kontrola prebiehajúceho testu:

Test spĺňa kritériá kvality, keď ožiarené negatívne/rozpúšťadlové kontrolné vzorky vykazujú životaschopnosť vyššiu ako 80 % v porovnaní s experimentom v tme s neožiarenou negatívnou/-rozpúšťadlovou kontrolnou vzorkou.

1.4.2.2.3. Životaschopnosť kontrolných vzoriek rozpúšťadla:

Absolútna optická hustota ($OD_{540\ NRU}$) neutrálnej červene extrahovanej z kontrolných vzoriek rozpúšťadla udáva, či 1×10^4 buniek nasadených do každej jamky vyrástlo v bežnom čase zdvojnásobenia počas dvoch dní skúšky. Test spĺňa kritériá prijateľnosti, ak je stredná hodnota $OD_{540\ NRU}$ pre neexponované vzorky $\geq 0{,}4$ (t. j. približne dvadsaťnásobok absorbancie rozpúšťadlového pozadia).

1.4.2.2.4. Pozitívna kontrola:

Známa fototoxická chemická látka sa testuje súbežne s každým testom fototoxicity 3T3 NRU *in vitro*. Odporúča sa chlórpromazín (CPZ). Pre CPZ testovaný podľa štandardného protokolu pri teste fototoxicity 3T3 NRU *in vitro* sa definovali tieto kritériá prijateľnosti testu: pre CPZ ožiarený (+Irr): IC_{50} = 0,1 až 2,0 µg g/ml, pre CPZ neožiarený (–Irr): IC_{50} = 7,0 až 90,0 µg/ml. Koeficient svetelnej dráždivosti (PIF) by mal byť > 6. Mala by sa monitorovať predchádzajúca funkčnosť tejto pozitívnej kontroly.

Namiesto chlórpromazínu sa môžu používať ako súbežné pozitívne porovnávacie vzorky aj iné fototoxické chemické látky, vhodné pre chemickú triedu alebo vlastnosti rozpustnosti vyhodnocovanej chemickej látky.

1.4.3. **Postup testovania (6), (7), (8), (16), (17):**

1.4.3.1. *Prvý deň:*

Do obvodových jamiek 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky tkanivových kultúr sa odpipetuje 100 µl kultivačného média (= slepé vzorky). Do zostávajúcich jamiek sa nadávkuje 100 µl bunkovej suspenzie s koncentráciou 1×10^5 buniek/ml do kultivačného média (= 1×10^4 buniek/jamka). Pre každú sériu koncentrácií jednotlivej testovanej látky a pre rozpúšťadlové a pozitívne porovnávacie vzorky by sa mali pripraviť dve doštičky.

Bunky sa inkubujú 24 hodín (pozri časť 1.4.1.2), až kým nevytvoria polosplývajúcu monomolekulovú vrstvu. Táto doba inkubácie umožňuje regeneráciu buniek, ich priľnavosť a exponenciálny rast.

1.4.3.2. *Druhý deň:*

Po inkubácii sa kultivačné médium z buniek dekantuje a opatrne premyje so 150 µl pufrovaného roztoku použitého na inkubáciu. Pridá sa 100 µl pufira obsahujúceho vhodnú koncentráciu testovanej chemickej látky alebo rozpúšťadla (kontrola rozpúšťadlom). Aplikuje sa 8 rôznych koncentrácií testovanej chemickej látky. Bunky sa testovanou chemickou látkou inkubujú v tme počas 60 minút (pozri časť 1.4.1.2 a druhý odsek v časti 1.4.1.4).

Vyberie sa jedna z dvoch doštičiek pripravených na každú sériu koncentrácií testovanej látky a porovnávacích vzoriek, spravidla náhodne, na stanovenie cytotoxicity (–Irr) (t. j. kontrolná doštička), a jedna (expozičná doštička) na stanovenie fotocytotoxicity (+Irr).

▼B

Na vykonanie expozície +Irr sa bunky pri izbovej teplote počas 50 minút ožarujú cez veko 96-jamkovej doštičky najvyššou dávkou žiarenia, ktorá je necytotoxická (pozri taktiež prílohu 2). Neožiarené doštičky (–Irr) sa uchovávajú pri izbovej teplote v tmavej škatuli 50 minút (= doba expozície účinkom svetla).

Testovací roztok sa dekantuje a dôkladne dvakrát premyje so 150 ul pufrovaného roztoku použitého na inkubáciu, ale neobsahujúceho testovaný materiál. Pufer sa nahradí kultivačným médiom a inkubuje sa (pozri časť 1.4.1.2) cez noc (18 – 22 hodín).

1.4.3.3 *Tretí deň:*

1.4.3.3.1. Vyhodnotenie mikroskopom

Bunky by sa mali preskúmať pomocou mikroskopu s fázovým kontrastom vzhľadom na ich rast, morfológiu a integritu monomolekulovej vrstvy. Zmeny v morfológii bunky a účinky na rast bunky by sa mali zaznamenať.

1.4.3.3.2. Test absorpcie neutrálnej červene

Bunky sa premyjú so 150 µl predhriateho pufira. Premývací roztok sa odstráni jemným poklepávaním. Pridá sa 100 µl neutrálnej červene s koncentráciou 50 µg/ml neutrálnej červene (NR) *(N8, N8,* 3-trimetyl-2, 8-fenazíndiamín monohydrochlorid, EINECS číslo 209-035-8; CAS číslo 553-24-2; C.I. 50040) do média bez séra (16) a 3 hodiny sa inkubuje spôsobom opísaným v časti 1.4.1.2. Po inkubácii sa médium NR odstráni a bunky sa premyjú so 150 µl pufra. Ten sa dekantuje a prebytočný pufer sa odstráni odsatím alebo odstredením.

Pridá sa presne 150 µl desorbčného roztoku NR (čerstvo pripravený v zložení 49 dielov vody + 50 dielov etanolu + 1 diel kyseliny octovej).

Mikrotitračná doštička sa jemne trepe na trepačke mikrotitračných doštičiek počas 10 minút, až do vy extrahovaní a NR z buniek a vytvorenia homogénneho roztoku.

Spektrofotometrom sa zmeria optická hustota extraktu NR pri 540 nm, pričom sa na porovnanie použije slepá skúška. Údaje sa uložia vo vhodnom formáte elektronického súboru na účely následnej analýzy.

2. **ÚDAJE**

2.1. KVALITA A KVANTITA ÚDAJOV

Údaje z testovania by mali umožniť zmysluplnú analýzu závislosti odozvy na koncentrácii získanej pri ožarovaní a bez neho, a pokiaľ je to možné, koncentrácii testovanej chemickej látky, pri ktorej je životaschopnosť buniek znížená na 50 % (IC_{50}). Ak sa zistí cytotoxicita, mal by sa rozsah koncentrácií a interval medzi jednotlivými koncentráciami nastaviť tak, aby to umožnilo zladiť krivku s experimentálnymi údajmi.

Pre jasne pozitívne ako aj pre jasne negatívne výsledky (pozri časť 2.3 prvý odsek) môže postačovať primárny experiment podporený jedným alebo viacerými predbežnými experimentmi na stanovenie rozsahu dávok.

▼B

Nepreukazné, hraničné alebo nejasné výsledky by sa mali objasniť ďalším testovaním (pozri aj časť 2.4 druhý odsek). V takýchto prípadoch by sa mala zvážiť modifikácia experimentálnych podmienok. Medzi experimentálne podmienky, ktoré by sa možno mohli modifikovať, patrí rozsah či odstup koncentrácií, čas predinkubácie a čas expozície ožiareniu. Pre chemické látky nestabilné vo vode môže byť vhodný kratší expozičný čas.

2.2. VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV

Na umožnenie vyhodnotenia údajov sa môže vypočítať koeficient svetelnej dráždivosti (PIF) alebo stredný svetelný účinok (MPE).

Pri výpočte parametrov fotocytotoxicity (pozri ďalej) sa súbor diskrétnych hodnôt závislost odozvy na koncentrácii musí aproximovať s použitím vhodnej spojitej krivky koncentračnej závislosti odozvy (vhodným modelom). Zladenie krivky s údajmi sa zvyčajne vykonáva metódou nelineárnej regresie (18). Na posúdenie vplyvu variability údajov na zladenú krivku sa odporúča samozavádzací postup *(bootstrap)*.

Koeficient svetelnej dráždivosti (PIF) sa vypočíta pomocou tohto vzorca:

$$PIF = \frac{IC_{50}(-Irr)}{IC_{50}(+Irr)}$$

Ak IC_{50} za prítomnosti alebo za neprítomnosti svetla nemožno vypočítať, nemožno pre testovaný materiál stanoviť PIF. Stredný svetelný účinok (MPE) je založený na porovnaní úplných kriviek závislosti odozvy na koncentrácii (19). Je definovaný ako vážený priemer celého reprezentatívneho súboru hodnôt svetelného účinku.

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i PE_{c_i}}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

Svetelný účinok PE_c pri každej koncentrácii C sa definuje ako súčin účinku odozvy RE_c a účinku koncentrácie DE_c, t. j. $PE_c = RE_c \times DE_c$. Účinok odozvy RE_c predstavuje rozdiel medzi odozvami pozorovanými za prítomnosti a za neprítomnosti svetla, t. j. $RE_c = R_c$ (–Irr) – R_c (+Irr). Účinok dávky je daný vzťahom

$$DE_c = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

pričom C* predstavuje koncentráciu ekvivalencie, t. j. koncentráciu, pri ktorej je odozva na +Irr rovnaká ako odozva na –Irr pri koncentrácii C. Ak C* nemožno stanoviť, pretože hodnoty odozvy krivky +Irr sú sústavne vyššie alebo nižšie ako hodnoty R_c (–Irr), tak hodnota účinku dávky sa stanoví na hodnotu 1. Váhové faktory wi sú dané najvyššou hodnotou odozvy, t. j. w_i = MAX {R_i (+Irr), R_i (–Irr) }. Súradnicová sieť pre koncentrácie C; sa zvolí tak, aby v koncentračnom intervale definovanom hodnotami koncentrácií použitými v rámci experimentu bol rovnaký počet bodov. Výpočet MPE je obmedzený na maximálnu hodnotu koncentrácie, pri ktorej aspoň jedna z dvoch kriviek stále vykazuje hodnotu odozvy najmenej 10 %. Ak je táto maximálna koncentrácia vyššia ako najvyššia koncentrácia použitá v rámci +Irr experimentu, zvyšná časť + Irr krivky sa nastaví na hodnotu odozvy „0“. V závislosti od toho, či je, alebo nie je MPE hodnota vyššia ako riadne zvolená hraničná hodnota (MPE_c 0,15), chemická látka je alebo nie je klasifikovaná ako fototoxická.

▼B

Program na výpočet PIF a MPE je dostupný v (20).

2.3. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Na základe validačnej štúdie (8) sa pri testovanej látke s PIF < 2 alebo MPE < 0,1 predikuje: „žiadna fototoxicita“. PIF > 2 a < 5 alebo MPE > 0,1 a < 0,15 predikuje: „pravdepodobná fototoxicita“ a PIF > 5 alebo MPE > 0,15 predikuje: „fototoxicita“.

Pre každé laboratórium zavádzajúce po prvýkrát túto skúšku by sa mali referenčné materiály uvedené v tabuľke 1 testovať pred testovaním testovaných chemických látok na posúdenie fototoxicity. Hodnoty PIF alebo MPE by sa mali približovať hodnotám uvedeným v tabuľke 1.

Tabuľka 1

Chemický názov	Číslo EINECS	Číslo CAS	PIF	MPE	Najvyššia úroveň absorpcie	Rozpúšťadlo (1)
aminodaron HCL	243-293-2	[19774-82-4]	>3,25	0,27-0,54	242 nm 300 nm (rameno)	etanol
chloropromazín HCL	200-701-3	[69-09-0]	>14,4	0,33-0,63	309 nm	etanol
norfloxacín	274-614-4	[70458-96-7]	>71,6	0,34-0,90	316 nm	acetonitril
antracén	204-371-1	[120-12-7]	>18,5	0,19-0,81	356 nm	acetonitril
protoporfyrin IX, dvojsodný	256-815-9	[50865-01-5]	>45,3	0,54-0,74	402 nm	etanol
L-histidín		[7006-35-1]	bez PIF	0,05-0,10	211 nm	voda
hexacholorofén	200-733-8	[70-30-4]	1,1–1,7	0,00-0,05	299 nm 317 nm (rameno)	etanol
laurylsulfát sodný	205-788-1	[151-21-3]	1,0–1,9	0,00-0,05	bez absorpcie	voda

(1) Rozpúšťadlo použité na meranie absorpcie.

2.4. INTERPRETÁCIA ÚDAJOV

Ak sa fototoxické účinky pozorujú iba pri najvyššej testovacej koncentrácii, (najmä v prípade testovaných chemických látok rozpustných vo vode) na posúdenie nebezpečnosti môžu byť potrebné ďalšie odhady. Tie sa môžu týkať údajov o absorpcii kožou a akumulácii chemikálie v koži a/alebo údajov z iných testov, napr. z testovania chemickej látky na zvieracej alebo ľudskej koži *in vitro,* alebo na modeloch kože.

▼B

Ak sa nepreukáže toxicita (+Irr a –Irr) a ak sú koncentrácie, ktoré sa mohli testovať, obmedzené malo rozpustnosťou, tak sa môže spochybniť kompatibilita testovanej látky s testom a malo by sa uvažovať o potvrdzujúcom testovaní s použitím napr. iného modelu.

3. **SPRÁVY**

SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí obsahovať aspoň tieto informácie:

Testovaná látka:

— identifikačné údaje, bežné generické názvy a čísla IUPAC a CAS, ak sú známe,

— fyzikálna povaha a čistota,

— fyzikálno-chemické vlastnosti relevantné na vykonanie štúdie,

— absorpčné spektrum UV/vis,

— stabilita a fotostabilita, ak sú známe.

Rozpúšťadlo:

— zdôvodnenie výberu rozpúšťadla,

— rozpustnosť testovanej chemickej látky v rozpúšťadle,

— percentuálny podiel rozpúšťadla prítomného v aplikačnom médiu.

Bunky:

— typ a zdroj buniek,

— neprítomnosť mykoplazmy,

— počet bukových pasáží, ak je známy,

— radiačná citlivosť buniek stanovená ožarovacím zariadením použitým pri teste fototoxicity 3T3 NRU *in vitro*.

Testovacie podmienky (1); *inkubáciapred aplikáciou a po nej:*

— typ a zloženie kultivačného média,

— inkubačné podmienky (koncentrácia CO_2; teplota; vlhkosť),

— trvanie inkubácie (predinkubačné kroky; poinkubačné kroky).

Testovacie podmienky (2); *aplikácia chemickej látky:*

— zdôvodnenie výberu koncentrácií testovaných chemických látok používaných pri ožarovaní a bez neho,

— v prípade obmedzenej rozpustnosti testovanej chemickej látky a pri neprítomnosti cytotoxicity: zdôvodnenie najvyššej testovanej koncentrácie,

— typ a zloženie aplikačného média (pufrovaný soľný roztok),

— trvanie aplikácie chemickej látky.

Testovacie podmienky (3); *ožarovanie:*

— zdôvodnenie výberu použitého svetelného zdroja,

▼B

— výrobca a typ svetelného zdroja a rádiometra,

— spektrálna charakteristika žiarenia svetelného zdroja,

— transmisné a absorpčné charakteristiky použitého filtra (použitých filtrov),

— charakteristiky rádiometra a podrobnosti o jeho kalibrácii,

— vzdialenosť svetelného zdroja od testovacieho systému,

— intenzita UVA ožiarenia v tejto vzdialenosti, vyjadrená v mW/cm^2,

— trvanie expozície UV/vis svetlu,

— dávka UVA (ožiarenie x čas) vyjadrená v J/cm^2,

— teplota bunkových kultúr počas ožarovania a bunkových kultúr súbežne uchovávaných v tme.

Testovacie podmienky (4); *test životaschopnosti príjmom neutrálnej červene:*

— zloženie pôsobiaceho média neutrálnej červene,

— trvanie inkubácie neutrálnej červene,

— inkubačné podmienky (koncentrácia CO_2; teplota; vlhkosť),

— podmienky extrakcie neutrálnej červene (extrakčné činidlo; trvanie),

— vlnová dĺžka použitá na spektrofotometrické odčítanie optickej hustoty neutrálnej červene,

— druhá vlnová dĺžka (referenčná), ak sa použije,

— obsah slepého roztoku pre spektrofotometriu, ak sa použije.

Výsledky:

— životaschopnosť bunky získaná pri každej koncentrácii testovanej chemickej látky, vyjadrená v percentách strednej životaschopnosti súbežných kontrolných vzoriek rozpúšťadla,

— krivky koncentračnej závislosti odozvy (koncentrácia testovanej chemickej látky proti relatívnej životaschopnosti bunky) získané pri súbežných +Irr a –Irr pokusoch,

— analýza kriviek koncentračnej závislosti odozvy: ak je to možné, tak približný výpočet hodnôt IC_{50} (+Irr) a IC_{50} (–Irr),

— porovnanie obidvoch kriviek koncentračnej závislosti na odozvu získaných s ožarovaním a bez neho, a to buď vypočítaním koeficientu svetelnej dráždivosti (PIF), alebo vypočítaním stredného svetelného účinku (MPE),

— kritériá prijateľnosti testu; súbežná kontrola rozpúšťadlom,

— absolútna životaschopnosť (optická hustota extraktu neutrálnej červene) ožiarených a neožiarených buniek,

— doterajšie údaje pre negatívnu kontrolnú vzorku a kontrolnú vzorku rozpúšťadla; stredné hodnoty a smerodajné odchýlky,

— kritériá prijateľnosti testu; súbežná pozitívna kontrola,

▼B

— IC_{50} (+Irr) a IC_{50} (–Irr) a PIF/MPE pozitívnej kontrolnej chemickej látky,

— doterajšie údaje pozitívnej kontrolnej chemickej látky: IIC_{50} (+Irr) a IC_{50} (–Irr) a PIF/MPE; stredné hodnoty a smerodajné odchýlky.

Rozbor výsledkov

Závery

4. **ODKAZY NA LITERATÚRU**

(1) Lovell W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. Toxic. In Vitro 7: 95 – 102.

(2) Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In „Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry“ Vol. 3 part 1. North Holland Publishing Co. Amsterdam. p XI – XXXV.

(3) Spielmann, H., Lovell, W.W., Hölzle, E., Johnson, B.E., Maurer, T., Miranda, M.A., Pape, W.J.W., Sapora, O., and Sladowski, D. (1994). *In vitro* phototoxicity testing: The report and recommendations of ECVAM Workshop 2. ATLA, 22, 314 – 348.

(4) Spikes, J.D. (1989). Photosensitization. In „The science of Photobiology“ Edited by K.C. Smith. Plenum Press, New York. 2nd edition, p 79 – 110.

(5) OECD (1997) Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 7 „Guidance Document On Direct Phototransformation Of Chemicals In Water“ Environment Directorate, OECD, Paris.

(6) Spielmann, H., Balls, M., Döring, B., Holzhütter, H.G., Kalweit, S., Klecak, G., L'Eplattenier, H., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Moldenhauer. F. Moore. L., Pape, W., Pfannbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLIPA project on *in vitro* phototoxicity testing: First results obtained with a Balb/c 3T3 cell phototoxicity assay. Toxic. In Vitro 8, 793 – 796.

(7) Anon (1998). Statement on the scientific validity of the 3T3 NRU PT test (an *in vitro* test for phototoxicity), European Commission, Joint Research Centre: ECVAM and DGXI/E/2, 3. November 1997, ATLA, 26, 7 – 8.

(8) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., Pechovitch, G. De Silva, O., Holzhütter, H.G., Clothier, R., Desolle, P., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., Maurer, T., Pfannenbecker, U., Potthast, J. M., Csato, M., Sladowski, D., Steiling, W., and Brantom, P. (1998). The international EU/-COLIPA *In vitro* phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial), part 1: the 3T3 NRU phototoxicity test. Toxic. In Vitro 12, 305 – 327.

(9) OECD (2002) Extended Expert Consultation Meeting on The In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test Guideline Proposal, Berlin, 30th-31th October 2001, Secretariat's Final Summary Report, 15th March 2002, OECD ENV/EHS, available upon request from the Secretariat.

(10) Borenfreund, E., and Puerner, J.A. (1985). Toxicity determination *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Lett., 24, 119 – 124.

(11) Hay, R.J. (1988) The seed stock concept and quality control for cell lines. Analytical Biochemistry 171, 225 – 237.

▼B

(12) Lambert L.A, Warner W.G., and Kornhauser A. (1996) Animal models for phototoxicity testing. In „Dermatotoxicology“, edited by F.N. Marzulli and H.I. Maibach. Taylor & Francis, Washington DC. 5th Edition, p 515 – 530.

(13) Tyrrell R.M., Pidoux M (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. Cancer Res., 47, 1825 – 1829.

(14) ISO 10977. (1993). Photography – Processed photographic colour films and paper prints – Methods for measuring image stability.

(15) Sunscreen Testing (UV.B) TECHNICALREPORT, CIE, International Commission on Illumnation, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275

(16) ZEBET/ECVAM/COLIPA – Standard Operating Procedure: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. 18 pgs.

(17) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC,* in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. ATLA 26, 679 – 708.

(18) Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. J. Biol. Systems 3, 127 – 138.

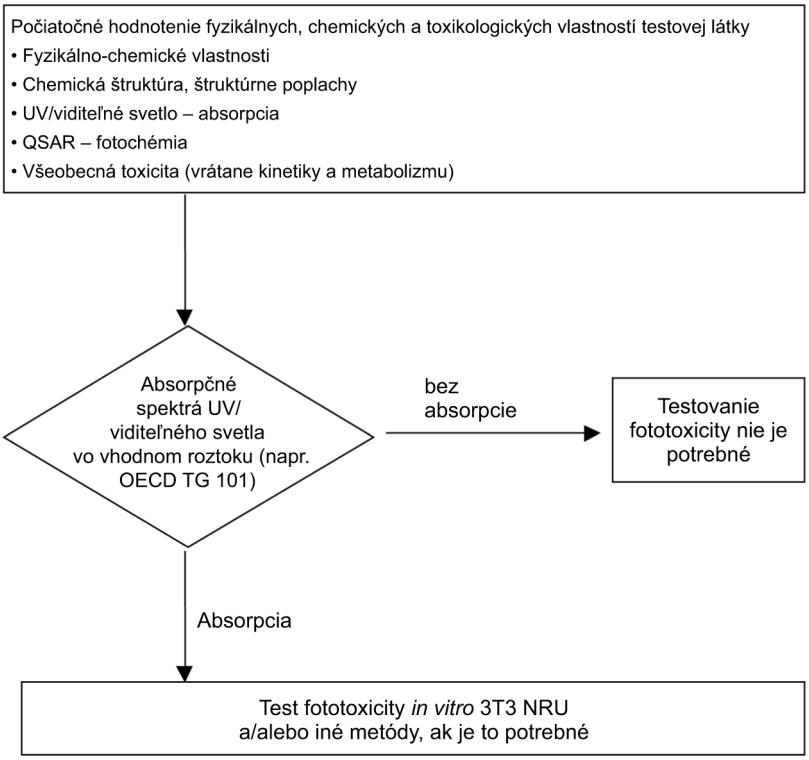
(19) Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. ATLA, 25, 445 – 462.

(20) http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.htm 1

▼B

Príloha 1

Úloha testu fototoxicity 3T3 NRU v sekvenčnom prístupe na testovanie fototoxicity chemických látok

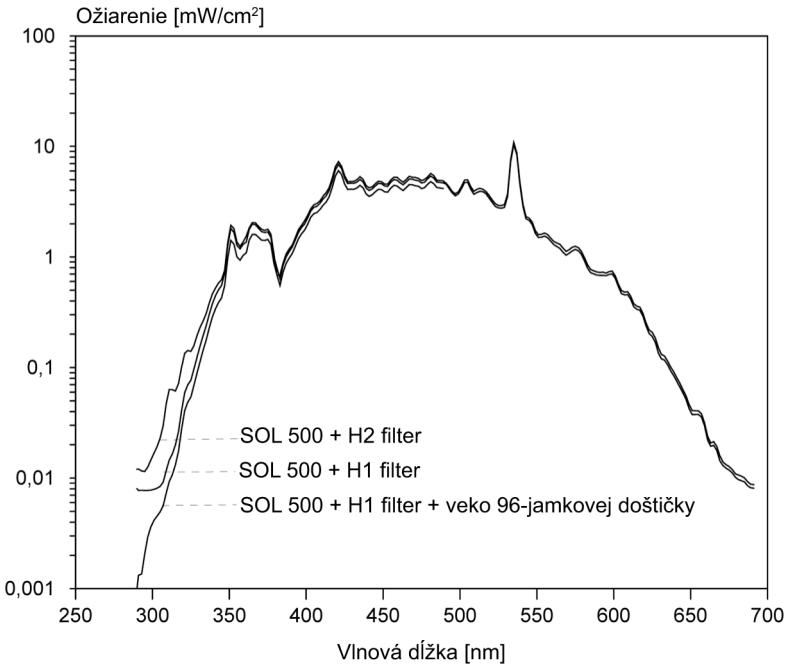


▼B

Príloha 2

Obrázok 1

Spektrálna distribúcia výkonu solárneho simulátora s filtrom



(pozri časť 1.4.1.5 druhý odsek)

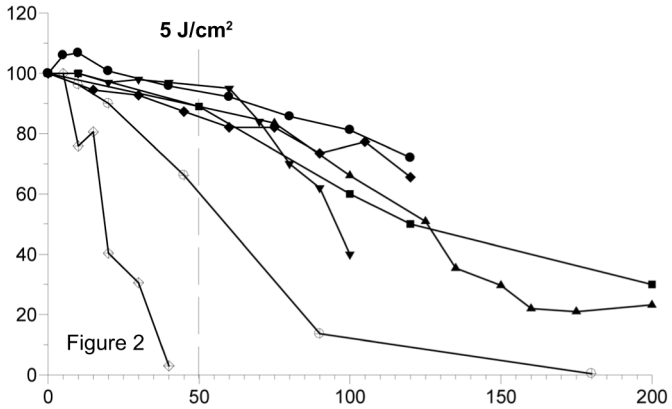
Na obrázku 1 je uvedený príklad prijateľnej spektrálnej distribúcie intenzity žiarenia solárneho simulátora s filtrom. Je zo zdroja dopovaného kovovým halogenidom, použitého pri validačnej štúdii skúšky fototoxicity 3T3 NRU (6), (8), (17). Je znázornený účinok dvoch rôznych filtrov a účinok ďalšieho filtrovania veka 96-jamkovej doštičky na bunkové kultúry. Filter H2 sa použil iba pri testovacích systémoch tolerantných k vyššej dávke UVB (test na modeli kože a foto-hemolytický test červených krviniek). Pri teste 3T3 NRU sa použil filter H1. Na obrázku je znázornené, že dodatočný filtrovací účinok veka doštičky je pozorovaný predovšetkým v oblasti UVB, pričom vekom preniká ešte stále dostatočné množstvo UVB zo spektra intenzity žiarenia na excitovanie chemických látok absorbujúcich v oblasti UVB, ako je amiodarón (pozri tabuľku 1).

▼B

Obrázok 2

Citlivosť buniek Balb/c 3T3 na ožiarenie (meraná v oblasti UVA)

Životaschopnosť buniek (% absorpcie neutrálnej červene v porovnávacích vzorkách bez svetla)



(pozri časť 1.4.1.5.2 druhý odsek, 1.4.2.2.1, 1.4.2.2.2)

Citlivosť buniek Balb/c 3T3 na ožiarenie solárnym simulátorom použitým pri validačnom pokuse testu fototoxicity 3T3 NRU, nameraná v oblasti UVA. Na obrázku sú znázornené výsledky získané v rámci predvalidačnej štúdie v siedmich rôznych laboratóriách (1). Zatiaľ čo dve krivky označené neplnými symbolmi boli získané so staršími bunkami (s vysokým počtom pasáží), ktoré sa museli nahradiť novými bunkovými materiálmi, krivky s plnými symbolmi znázorňujú bunky s prijateľnou toleranciou k ožiareniu.

Z týchto údajov bola odvodená najvyššia necytotoxická dávka ožiarenia 5 J/cm^2 (vertikálna prerušovaná čiara). Horizontálna prerušovaná čiara predstavuje popritom maximálny prijateľný účinok ožiarenia uvedený v časti 1.4.2.2.

▼M3

B. 42. **SENZIBILIZÁCIA KOŽE: LOKÁLNA SKÚŠKA LYMFATICKÝCH UZLÍN**

ÚVOD

1. Usmernenia Organizácie pre hospodársku spoluprácu a rozvoj (OECD) na testovanie chemikálií a testovacie metódy EÚ vychádzajúce z týchto usmernení sa pravidelne revidujú vzhľadom na vedecký pokrok, zmeny regulačných potrieb a dobré životné podmienky zvierat. Pôvodná testovacia metóda (TM) na určenie senzibilizácie kože u myší, tzv. lokálna skúška lymfatických uzlín (LLNA; usmernenie OECD na vykonávanie testov 429; kapitola B.42 tejto prílohy) už bola prijatá (1). Podrobnosti validácie LLNA a revízia prác v tejto oblasti boli uverejnené v (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11). Aktualizovaná LLNA je založená na hodnotení skúseností a vedeckých údajov (12). Táto testovacia metóda je druhou testovacou metódou vytvorenou na posúdenie potenciálu chemikálií (látok a zmesí) spôsobiť senzibilizáciu kože u zvierat. Prvá testovacia metóda (t. j. usmernenie OECD na vykonávanie testov 406; kapitola B.6 tejto prílohy) využíva testy s morčatami, a to maximalizačný test morčiat a Buehlerov test (13). LLNA poskytuje výhody v porovnaní s metódou B.6 a usmernením OECD na vykonávanie testov 406 (13), pokiaľ ide o dobré životné podmienky zvierat. Táto aktualizovaná testovacia metóda LLNA zahŕňa súbor noriem výkonnosti (PS) (dodatok 1), ktoré možno použiť na hodnotenie stavu validácie nových a/alebo upravených testovacích metód, ktoré sú z funkčného a mechanického hľadiska podobné LLNA v súlade so zásadami usmerňujúceho dokumentu OECD č. 34 (14).

2. LLNA skúma indukčnú fázu senzibilizácie kože a poskytuje kvantitatívne údaje vhodné na hodnotenie odozvy na dávku. Treba poznamenať, že ľahké/mierne senzibilizátory, ktoré sa odporúčajú ako vhodné chemikálie na pozitívnu kontrolu v testovacích metódach na morčatách (t. j. kapitola B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov č. 406) (13), sú tiež vhodné na použitie pri LLNA (6) (8) (15). Redukovaná lokálna skúška lymfatických uzlín (rLLNA), pri ktorej by sa mohlo využívať až o 40 % menej zvierat, je v tejto testovacej metóde tiež opísaná ako jedna z možností (16) (17) (18). Metódu rLLNA možno použiť v prípade, ak vznikla regulačná potreba potvrdiť negatívny predpoklad potenciálu senzibilizácie kože, za predpokladu, že existuje súlad so všetkými ostatnými špecifikáciami protokolov LLNA, ako je to opísané v tejto testovacej metóde. Predpoklad negatívneho výsledku by sa mal urobiť na základe všetkých dostupných informácií, ako je opísané v odseku 4. Pred použitím metódy rLLNA je potrebné poskytnúť jasné a vedecké odôvodnenia použitia tejto metódy. Ak sa pri rLLNA napriek očakávaniam dosiahne pozitívny alebo nejasný výsledok, možno bude potrebné vykonať ďalšie testovanie, aby bola možná interpretácia alebo objasnenie zistenia. Skúška rLLNA by sa nemala využívať na identifikáciu nebezpečnosti testovaných látok, ktoré spôsobujú senzibilizáciu kože v prípade, keď sú potrebné informácie o odozve na dávku, ako napríklad ďalšia kategorizácia pre nariadenie (ES) č. 1272/2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí a globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemických látok Organizácie Spojených národov (OSN).

VYMEDZENIE POJMOV

3. Použité definície sú uvedené v dodatku 2.

ÚVODNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

4. LLNA poskytuje alternatívnu metódu na identifikáciu možných chemikálií spôsobujúcich senzibilizáciu kože. Neznamená to nevyhnutne, že vo všetkých prípadoch sa má použiť LLNA namiesto testu s morčatami (t. j. metóda B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (13), ale skôr to, že táto skúška je rovnako hodnotná a môže sa použiť ako alternatíva, v ktorej pozitívne a negatívne výsledky vo všeobecnosti nevyžadujú ďalšie potvrdenie. Testovacie laboratórium by malo posúdiť všetky dostupné informácie o testovanej látke pred uskutočnením štúdie. Takéto informácie budú obsahovať identitu a chemickú štruktúru testovanej látky,

▼M3

jej fyzikálno-chemické vlastnosti, výsledky všetkých ostatných *in vitro* alebo *in vivo* testov toxicity s testovanou látkou a toxikologické údaje o štruktúrne príbuzných chemikáliách. Tieto informácie treba vziať do úvahy pri stanovovaní, či LLNA je pre danú látku vhodná (vzhľadom na nezlučiteľnosť obmedzených druhov chemikálií s LLNA – pozri odsek 5), a ako pomoc pri výbere dávok.

5. LLNA je metóda *in vivo*, a to znamená, že pri posúdení aktivity alergickej kontaktnej senzibilizácie sa nevylučuje používanie zvierat. Môže však umožniť zníženie počtu zvierat potrebných na tento účel. Okrem toho LLNA ponúka značné zjemnenie spôsobu, akým sa zvieratá používajú na testy alergickej kontaktnej senzibilizácie (znižuje bolesť a utrpenie zvierat). LLNA sa zakladá na posudzovaní imunologických reakcií vyvolaných chemikáliami počas indukčnej fázy senzibilizácie. Na rozdiel od testov s morčatami (t. j. metóda B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (13) LLNA nevyžaduje, aby sa vyvolali reakcie dermálnej hypersenzitivity. Okrem toho LLNA nevyžaduje použitie adjuvansu ako v prípade maximalizačného testu morčiat (13). Tým LLNA znižuje bolesť a utrpenie zvierat. Napriek výhodám, ktoré LLNA má v porovnaní s metódou B.6 a usmernením OECD na vykonávanie testov 406, je potrebné uznať, že existujú určité obmedzenia, v prípade ktorých by sa mohlo vyžadovať použitie metódy B.6 alebo usmernenia OECD na vykonávanie testov 406 (13) [napr. falošné negatívne zistenia v LLNA s určitými kovmi, falošné pozitívne zistenia s určitými kožnými dráždivými látkami (ako napríklad niektoré druhy povrchovo aktívnych chemikálií) (19) (20) alebo rozpustnosť testovanej látky]. Okrem toho chemické skupiny alebo látky, ktoré obsahujú potenciálne zmätočné funkčné skupiny (21), si tiež môžu vyžadovať použitie testov s morčatami (t. j. B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406 (13). Ďalej na základe obmedzenej validačnej databázy, ktorá sa skladá predovšetkým z prípravkov na ochranu rastlín, pri LLNA je pravdepodobnejšie, že pri týchto druhoch testovacích látok sa dosiahne pozitívny výsledok ako pri teste s morčatami (22). Pri testovaní prípravkov by sa však malo vziať do úvahy zahrnutie podobných látok so známymi výsledkami ako referenčných látok na preukázanie toho, že LLNA riadne funguje (pozri odsek 16). Okrem takto identifikovaných obmedzení by sa LLNA mala uplatňovať pri testovaní všetkých látok okrem prípadov, keď tieto látky majú vlastnosti, ktoré by mohli narúšať presnosť LLNA.

PRINCÍP TESTU

6. Základným princípom, na ktorom sa LLNA zakladá, je, že senzibilizátory vyvolávajú primárnu proliferáciu lymfocytov v lymfatickej uzline v drénovanom mieste aplikácie testovanej látky. Táto proliferácia je úmerná dávke a účinnosti aplikovaného alergénu a poskytuje jednoduchý prostriedok na získanie kvantitatívneho merania senzibilizácie. Proliferácia sa meria porovnávaním priemeru proliferácie v každej pokusnej skupine s priemerom proliferácie v kontrolnej skupine, ktorej sa podáva nosič (VC). Stanoví sa pomer priemernej proliferácie v každej ošetrenej skupine a priemernej proliferácie v súbežnej kontrolnej skupine s nosičom, ktorý sa označuje ako stimulačný index (SI), a musí mať hodnotu aspoň tri pred ďalším prípadným vyhodnotením testovanej látky ako potenciálneho senzibilizátora kože. Uvedené metódy sa zakladajú na používaní rádioaktívneho značenia *in vivo* na meranie proliferácie zvýšeného počtu buniek v drénovaných ušných lymfatických uzlinách. Môžu sa však použiť iné koncové body na posúdenie počtu proliferujúcich buniek za predpokladu, že budú úplne splnené požiadavky na normy výkonnosti (dodatok 1).

▼M3

OPIS SKÚŠKY

Výber druhov zvierat

7. Vybraným druhom pre tento test je myš. Použijú sa mladé dospelé negravidné samice myši, ktoré nikdy nevrhli mláďatá, kmeňa CBA/Ca alebo CBA/J. Na začiatku štúdie by zvieratá mali byť vo veku 8 – 12 týždňov a rozdiel medzi hmotnosťami zvierat má byť minimálny a nemá byť vyšší ako 20 % priemernej hmotnosti. Alternatívne sa môžu použiť iné kmene a samce, ak sa na základe získaných údajov dá uspokojivo dokázať, že neexistujú významné odlišnosti špecifické pre kmeň a/alebo pohlavie v odozve na LLNA.

Podmienky umiestnenia a kŕmenia

8. Myši by sa mali umiestniť v skupinách (23), pokiaľ sa neposkytne primerané vedecké odôvodnenie ich umiestnenia jednotlivo. Teplota miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 ± 3 °C. Aj keď relatívna vlhkosť by mala byť aspoň 30 % a pokiaľ možno by nemala prevyšovať 70 %, okrem obdobia počas čistenia miestnosti, cieľom je, aby relatívna vlhkosť dosahovala 50 % – 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody.

Príprava zvierat

9. Zvieratá sa vyberú náhodne a sú označené tak, aby sa umožnila jednotlivá identifikácia (ale nie formou ušných značiek), a držia sa v klietkach aspoň 5 dní pred začiatkom podávania dávok, aby sa aklimatizovali na laboratórne podmienky. Pred začatím ošetrenia sa všetky zvieratá vyšetria, aby sa zaistilo, že nemajú žiadne viditeľné kožné poranenia.

Príprava dávok

10. Chemikálie v tuhom skupenstve by sa pred podaním dávky do ucha myši mali rozpustiť alebo suspendovať v rozpúšťadlách alebo nosičoch, a ak je to vhodné, rozriediť. Kvapalné chemikálie možno podávať priamo alebo pred podaním rozriediť. V prípade nerozpustných chemikálií, ako napríklad tých, ktoré sa vo všeobecnosti používajú ako zdravotnícke pomôcky, by sa pred podaním dávky do ucha myši mala uskutočniť zvýšená extrakcia vo vhodnom rozpúšťadle, aby sa odhalili všetky extrahovateľné zložky, ktoré sa budú testovať. Testované látky sa pripravujú každý deň okrem prípadu, keď údaje o stabilite preukazujú prijateľnosť uskladnenia.

Kontrola spoľahlivosti

11. Riadne vykonanie skúšky sa dokazuje pomocou pozitívnych kontrolných chemikálií, ktoré reagujú primeranou a reprodukovateľnou citlivosťou ako senzibilizujúce testované látky, pre ktoré je dobre charakterizovaná šírka odozvy. Odporúča sa zahrnúť súbežnú pozitívnu kontrolu, pretože to dokazuje kompetenciu laboratória úspešne vykonať každú skúšku a umožňuje posúdenie vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti a porovnateľnosti. Pozitívnu kontrolu v každej štúdii vyžadujú aj niektoré regulačné orgány, a preto by používatelia mali pred vykonaním skúšky LLNA konzultovať s príslušnými orgánmi. Rutinné použitie súbežnej pozitívnej kontroly sa podporuje aj preto, aby sa predišlo potrebe ďalšieho testovania na zvieratách s cieľom splniť také požiadavky, ktoré by mohli vyplynúť z použitia periodickej pozitívnej kontroly (pozri odsek 12). Pozitívna kontrola by mala spôsobiť pozitívnu odozvu na LLNA pri úrovni expozície, pri ktorej sa očakáva nárast stimulačného indexu (SI) > 3 v porovnaní s negatívnou kontrolnou skupinou. Dávka pozitívnej kontroly

▼M3

by sa mala zvoliť tak, aby nespôsobila nadmerné podráždenie kože alebo systémovú toxicitu a aby indukcia bola reprodukovateľná, ale nie nadmerná (t. j. SI > 20 by bola nadmerná indukcia). Vhodnými pozitívnymi kontrolami sú 25 % 3-fenyl-2-hexylpropenál [číslo CAS (Chemical Abstracts Service) 101-86-0] v acetóne, olivový olej (v pomere 4: 1, objemové percentá) a 5 % benzotiazol-2-tiol (číslo CAS 149-30-4) v *N,N*-dimetylformamide (pozri dodatok 1 tabuľku 1). Môžu sa vyskytnúť okolnosti, keď sa v riadne zdôvodnených prípadoch môžu použiť iné pozitívne kontroly, ktoré spĺňajú uvedené kritériá.

12. Hoci sa odporúča súbežná pozitívna kontrolná skupina, môžu sa vyskytnúť situácie, keď môže byť vhodné periodické testovanie (t. j. v intervaloch najviac 6 mesiacov) pozitívnych kontrol v prípade tých laboratórií, ktoré vykonávajú LLNA pravidelne (t. j. LLNA vykonávajú v priebehu jedného mesiaca aspoň raz) a ktoré majú zavedenú historickú databázu pozitívnych kontrol, ktorá preukazuje schopnosť laboratória dosahovať reprodukovateľné a presné výsledky s pozitívnymi kontrolami. Primeranú odbornosť s použitím LLNA možno úspešne preukázať dosiahnutím konzistentných pozitívnych výsledkov s pozitívnou kontrolou najmenej v 10 nezávislých testoch uskutočnených v určitom primeranom období (t. j. v období kratšom ako jeden rok).

13. Súbežná pozitívna kontrolná skupina by sa mala zahrnúť vždy, keď dôjde k procedurálnej zmene v súvislosti s LLNA (napr. k zmene vyškoleného personálu, zmene materiálov a/alebo reagentov používaných pri testovacej metóde, zmene nástrojov používaných pri testovacej metóde, zmene zdroja testovaných zvierat), a takéto zmeny je potrebné zaznamenať v laboratórnych správach. Je potrebné zvážiť vplyv týchto zmien na primeranosť predtým zriadenej historickej databázy pri určovaní potreby zriadenia novej historickej databázy na zaznamenávanie konzistentnosti výsledkov pozitívnej kontroly.

14. Výskumní pracovníci by si mali uvedomiť, že rozhodnutie vykonať štúdiu pozitívnych kontrol na periodickom základe namiesto súbežných pozitívnych kontrol môže mať následky na primeranosť a prijateľnosť negatívnych výsledkov štúdie získaných bez súbežnej pozitívnej kontroly počas intervalu medzi každou periodickou štúdiou pozitívnej kontroly. Ak sa dosiahne napríklad falošný negatívny výsledok v periodickej štúdii pozitívnej kontroly, negatívne výsledky získané s testovanou látkou v intervale medzi poslednou prijateľnou periodickou štúdiou pozitívnej kontroly a neprijateľnou periodickou štúdiou pozitívnej kontroly možno spochybniť. Dôsledky týchto výsledkov treba dôkladne zvážiť pri určovaní toho, či vykonať súbežné pozitívne kontroly alebo iba periodické pozitívne kontroly. Treba tiež zvážiť použitie menšieho počtu zvierat v súbežnej pozitívnej kontrolnej skupine, ak je to vedecky odôvodnené a ak laboratórium na základe konkrétnych laboratórnych historických údajov preukáže, že možno použiť menší počet myší (12).

15. Aj keď by sa pozitívna kontrola mala testovať v nosiči, o ktorom je známe, že vyvoláva konzistentnú odozvu (napr. acetón: olivový olej v pomere 4: 1, objemové percentá), môžu sa vyskytnúť určité regulačné situácie, v ktorých bude potrebné vykonať aj testovanie v neštandardnom nosiči (klinicky/chemicky zodpovedajúcom roztoku) (24). Ak sa súbežná pozitívna kontrola testuje v odlišnom nosiči ako testovaná látka, potom treba do testu súbežnej pozitívnej kontroly zahrnúť samostatnú kontrolnú skupinu, ktorej sa podáva nosič.

16. V prípadoch hodnotenia testovaných látok, ktoré patria do konkrétnej chemickej triedy, alebo rozsahu odoziev môžu byť užitočné aj referenčné látky, aby sa preukázalo, že testovacia metóda na zisťovanie potenciálu týchto druhov testovaných látok spôsobiť senzibilizáciu kože funguje riadne. Vhodné referenčné látky majú mať tieto vlastnosti:

— štrukturálnu a funkčnú podobnosť s triedou testovanej látky, ktorá je predmetom testovania,

— známe fyzikálne/chemické vlastnosti,

— podporné údaje z LLNA,

— podporné údaje z ďalších zvieracích a/alebo ľudských modelov.

▼M3

TESTOVACÍ POSTUP

Počet zvierat a veľkosť dávky

17. Na dávkovú skupinu sa používajú aspoň štyri zvieratá, aspoň tri koncentrácie testovanej látky a k tomu súbežná negatívna kontrolná skupina, ktorej sa podáva iba nosič pre testovanú látku, a pozitívna kontrola (súbežná alebo nedávna, podľa laboratórnych pravidiel s prihliadnutím na odseky 11 – 14). Treba zvážiť testovanie viacerých dávok pozitívnej kontroly, najmä ak sa testuje na prerušovanej báze. So zvieratami v kontrolných skupinách by sa malo zaobchádzať rovnakým spôsobom ako s pokusnými zvieratami okrem prípadov, keď sa ošetrovanie testovanou látkou nevykonáva.

18. Výber dávky a nosiča by mal byť založený na odporúčaniach uvedených v odkazoch (3) a (5). Následné dávky sa zvyčajne vyberajú z vhodných sérií koncentrácií, napr. 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % atď. Výber zo sérií koncentrácií je potrebné primerane vedecky zdôvodniť. Všetky existujúce informácie o toxicite (napr. akútnej toxicite a podráždení kože), ako aj štrukturálne a fyzikálno-chemické informácie o predmetnej testovanej látke (a/alebo štrukturálne príbuzných látkach) by sa mali prípadne posúdiť výberom troch po sebe idúcich koncentrácií tak, aby najvyššia koncentrácia maximalizovala expozíciu, pričom by sa však zabránilo systémovej toxicite a/alebo nadmernému lokálnemu podráždeniu kože (3) (25). Ak tieto informácie nie sú k dispozícii, možno bude potrebné vykonať počiatočný predbežný skríningový test (pozri odseky 21 – 24).

19. Nosič by nemal ovplyvňovať výsledok testu a mal by sa vybrať na základe maximalizácie rozpustnosti s cieľom získať najvyššiu dosiahnuteľnú koncentráciu, pričom vznikne roztok/suspenzia vhodná na aplikáciu testovanej látky. Odporúčané nosiče sú: acetón: olivový olej (4: 1, objemové percentá), *N,N*-dimetylformamid, metyletylketón, propylénglykol a dimetylsulfoxid (19), ale môžu sa použiť aj iné nosiče, ak sa uvedie uspokojivé vedecké zdôvodnenie. V určitých situáciách môže byť potrebné použiť ako ďalšiu kontrolu klinicky vhodný roztok alebo komerčný prípravok, v ktorom sa testovaná látka predáva. Osobitnú pozornosť je potrebné venovať zabezpečeniu toho, aby sa hydrofilné testované látky zabudovali do systému nosiča, ktorý zvlhčuje pokožku, a rýchlo neunikli, a to začlenením vhodných rozpúšťadiel (napr. 1 % Pluronic® L92). Preto je potrebné vyhýbať sa použitiu čisto vodných nosičov.

20. Spracovanie lymfatických uzlín jednotlivých myší umožňuje posúdiť variabilitu medzi zvieratami a štatisticky porovnať rozdiel medzi meraniami testovanej látky a kontrolnej skupiny, ktorej sa podáva nosič (pozri odsek 35). Okrem toho sa po poskytnutí informácií o jednotlivých zvieratách môže prehodnotiť možnosť zníženia počtu myší v pozitívnej kontrolnej skupine (12). Navyše niektoré regulačné orgány požadujú zber údajov o jednotlivých zvieratách. Niektoré regulačné orgány však môžu považovať za prijateľné aj spojené údaje o zvieratách a v takejto situácii majú používatelia možnosť zbierať buď údaje o jednotlivých zvieratách, alebo spojené údaje o zvieratách.

Predbežný skríningový test

21. V prípade, že nie sú k dispozícii informácie na stanovenie najvyššej dávky testovanej látky (pozri odsek 18), treba vykonať predbežný skríningový test s cieľom stanoviť primeranú úroveň testovanej dávky na použitie v LLNA. Cieľom predbežného skríningového testu je poskytnúť usmernenie na výber maximálnej úrovne dávky na použitie v hlavnej štúdii LLNA v prípade, že nie sú dostupné informácie o koncentrácii, ktorá spôsobuje systémovú toxicitu (pozri odsek 23) a/alebo nadmerné lokálne podráždenie kože (pozri odsek 24). Maximálna úroveň testovanej dávky by mala obsahovať 100 % testovanej látky v prípade kvapalín alebo maximálnu možnú koncentráciu v prípade tuhých látok alebo suspenzií.

▼M3

22. Predbežný skríningový test sa vykonáva za podmienok, ktoré sú identické s hlavnou štúdiou LLNA, s tým rozdielom, že sa neposudzuje proliferácia lymfatickej uzliny a môže sa použiť menší počet zvierat na dávkovú skupinu. Navrhuje sa jedno alebo dve zvieratá na dávkovú skupinu. U všetkých myší sa každý deň pozorujú klinické príznaky systémovej toxicity alebo lokálneho podráždenia v mieste aplikácie. Telesné hmotnosti zvierat sa zaznamenajú na začiatku testu a pred usmrtením (deň 6). Obidve uši každej myši sa vyšetria, či nemajú príznaky erytému (sčervenania kože), a vyhodnotia sa podľa tabuľky 1 (25). Hrúbka ucha sa meria pomocou meradla hrúbky (napr. digitálnym mikrometrom alebo meradlom hrúbky Peacock Dial) v deň 1 (pred aplikáciou dávky), v deň 3 (približne 48 hodín po prvej dávke) a v deň 6. Okrem toho možno hrúbku ucha v deň 6 určiť na základe meraní vážením vzoriek uší, ktoré by sa malo vykonať po humánnom usmrtení zvierat. Nadmerné lokálne podráždenie kože indikuje hodnota erytému ≥ 3 a/alebo zvýšenie hrúbky ucha o ≥ 25 % v ktorýkoľvek deň merania (26) (27). Najvyššia dávka vybraná pre hlavnú štúdiu LLNA bude najbližšia nižšia dávka z predbežných skríningových sérií koncentrácií (pozri odsek 18), ktorá nespôsobuje systémovú toxicitu a/ani nadmerné lokálne podráždenie kože.

Tabuľka 1

Hodnotenia erytému

Pozorovanie	Hodnotenie
Žiadny erytém	0
Veľmi slabý erytém (sotva pozorovateľný)	1
Jasne ohraničený erytém	2
Mierny až silný erytém	3
Výrazný erytém (tmavočervený) až vytvorenie chrasty zabraňujúcej posúdeniu erytému	4

23. Okrem 25 % zvýšenia hrúbky ucha (26) (27) sa štatisticky významné zvýšenie hrúbky ucha v testovanej skupine myší v porovnaní s kontrolnou skupinou myší použilo aj na identifikáciu dráždivých látok v LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Štatisticky významné zvýšenie hrúbky ucha môže nastať aj vtedy, keď dôjde k menšiemu zvýšeniu ako 25 %, nespája sa však konkrétne s nadmerným podráždením kože (30) (32) (33) (34).

24. Nasledujúce klinické pozorovania môžu indikovať systémovú toxicitu (35) (36), ak sú súčasťou integrovaného posudzovania, to znamená, že môžu indikovať maximálnu úroveň dávky na použitie v hlavnej štúdii LLNA: zmeny funkcie nervového systému (napr. piloerekcia, ataxia, triaška a kŕče); zmeny správania (napr. agresia, zmena pri čistení, výrazná zmena stupňa aktivity); zmena dýchania (t. j. zmena frekvencie alebo intenzity dýchania, ako napríklad zadúšanie, dýchavičnosť a šelest) a zmeny spotreby potravy a vody. Okrem toho treba v hodnotení zvážiť príznaky letargie a/alebo apatie a akékoľvek klinické príznaky silnejšej alebo dlhodobejšej bolesti a utrpenia alebo viac ako 5 % zníženie telesnej hmotnosti medzi dňom 1 a 6 a úmrtnosť. Umierajúce zvieratá alebo zvieratá, ktoré majú očividne silné bolesti alebo vykazujú pretrvávajúce príznaky silného utrpenia, by sa mali humánnym spôsobom usmrtiť (37).

▼M3

Harmonogram pokusov v hlavnej štúdii

25. Harmonogram pokusov v rámci skúšky je takýto:

— Deň 1: Označte každé zviera a zaznamenajte jeho hmotnosť a akékoľvek klinické pozorovania. Začnite s aplikáciou 25 µl z príslušného zriedenia testovanej látky, samotného nosiča alebo pozitívnej kontroly (súbežnej alebo súčasnej, podľa laboratórnych pravidiel s prihliadnutím na odseky 11 – 15) na zadnú stranu každého ucha.

— Dni 2 a 3: Zopakujte aplikačný postup uskutočnený v deň 1.

— Dni 4 a 5: Žiadne ošetrenie.

— Deň 6: Zaznamenajte hmotnosť každého zvieraťa. Injekčne podajte všetkým pokusným a kontrolným myšiam 250 µl sterilného fosfátom tlmeného fyziologického roztoku (PBS) obsahujúceho 20 µCi ($7{,}4 \times 10^5$ Bq) ^{3}H-metyltymidínu cez chvostovú žilu. Alternatívne injekčne podajte všetkým myšiam 250 µl sterilného PBS obsahujúceho 2 µCi ($7{,}4 \times 10^4$ Bq) ^{125}I-jódodeoxyuridínu a 10^{-5}M-fluorodeoxyuridínu cez chvostovú žilu. O päť hodín sa zvieratá humánne usmrtia. Drénované ušné lymfatické uzliny sa odstránia z každého ucha myši a spracujú sa spoločne v PBS pre každé zviera (metóda jednotlivých zvierat) alebo sa lymfatické uzliny odstránia z každého ucha a spoločne spracujú v PBS pre každú pokusnú skupinu (metóda spojených pokusných skupín). Údaje a diagramy identifikácie a disekcie lymfatických uzlín možno nájsť v odkaze (12). Pri ďalšom monitorovaní lokálnej odozvy kože v hlavnej štúdii možno do protokolu štúdie zahrnúť ďalšie parametre, ako napríklad hodnotenie erytému ucha alebo merania hrúbky ucha (získané pomocou meradla hrúbky alebo vážením vzoriek uší pri pitve).

Príprava bunkových suspenzií

26. Jednobunková suspenzia buniek lymfatických uzlín (LNC), odobraná bilaterálne s použitím metódy jednotlivých zvierat alebo alternatívnej metódy spojenej pokusnej skupiny, sa pripravuje jemným mechanickým pretlačením cez sitko z nerezovej ocele so šírkou oka 200 µm alebo inou prijateľnou technikou na prípravu jednobunkovej suspenzie. Bunky lymfatických uzlín sa dvakrát premyjú v prebytku PBS a DNA sa vyzráža 5 % kyselinou trichlóroctovou (TCA) pri 4 °C počas 18 hod. (3). Pelety sa buď opätovne suspendujú v 1 ml TCA a prenesú do scintilačných fľaštičiek obsahujúcich 10 ml scintilačnej kvapaliny na čítanie ^{3}H, alebo sa prenesú priamo do gammačítacích túb na čítanie ^{125}I.

Stanovenie proliferácie buniek (naviazaná rádioaktivita)

27. Začlenenie ^{3}H-metyltymidínu sa meria β-scintilačným čítaním ako dezintegrácia za minútu (DPM). Začlenenie ^{125}I-jododeoxyuridínu sa meria čítaním ^{125}I a tiež sa vyjadruje ako dezintegrácia za minútu (DPM). V závislosti od použitej metódy sa začlenenie vyjadrí ako DPM/myš (metóda jednotlivých zvierat) alebo DPM/pokusná skupina (metóda spojenej pokusnej skupiny).

Redukovaná LLNA

28. V určitých situáciách, keď vznikne regulačná potreba potvrdiť negatívny predpoklad potenciálu senzibilizácie kože, možno použiť voliteľný protokol rLLNA (16) (17) (18) s použitím menšieho počtu zvierat, ak existuje súlad so všetkými ostatnými špecifikáciami protokolov LLNA v tejto testovacej metóde. Pred použitím metódy rLLNA je potrebné poskytnúť jasné a vedecké odôvodnenia použitia tejto metódy. Ak sa dosiahne pozitívny alebo nejasný výsledok, možno bude potrebné vykonať ďalšie testovanie, aby bola možná interpretácia alebo objasnenie zistenia.

▼M3

29. Zníženie počtu dávkových skupín je jediný rozdiel medzi protokolmi testovacích metód LLNA a rLLNA a z tohto dôvodu rLLNA neposkytuje informácie o odozve na dávku. Preto by sa rLLNA nemala používať v prípadoch, keď sú potrebné informácie o odozve na dávku. Podobne ako pri viacdávkovej LLNA by koncentrácia testovanej látky hodnotenej v rLLNA mala byť maximálnou koncentráciou, ktorá nespôsobuje zjavnú systémovú toxicitu a/ani nadmerné lokálne podráždenie kože myši (pozri odsek 18).

POZOROVANIA

Klinické pozorovania

30. Každá myš sa starostlivo vyšetrí aspoň jedenkrát denne na všetky klinické príznaky, či už ide o lokálne podráždenie v mieste aplikácie, alebo systémovú toxicitu. Všetky pozorovania sa systematicky zaznamenávajú, pričom každá myš má individuálny záznam. Plány na monitorovanie by mali zahŕňať kritériá na rýchlu identifikáciu tých myší, ktoré vykazujú systémovú toxicitu, nadmerné lokálne podráždenie alebo poleptanie kože a ktoré majú byť humánne usmrtené (37).

Telesné hmotnosti

31. Ako sa uvádza v odseku 25, telesné hmotnosti jednotlivých zvierat by sa mali odmerať na začiatku testu a pri naplánovanom usmrtení zvierat.

VÝPOČET VÝSLEDKOV

32. Výsledky sa vyjadrujú ako stimulačný index (SI). Pri použití metódy jednotlivých zvierat sa SI získa vydelením priemernej hodnoty DPM/myš v rámci každej skupiny, ktorej sa podávala testovaná látka, a pozitívnej kontrolnej skupiny priemernou hodnotou DPM/myš kontrolnej skupiny, ktorej sa podávalo rozpúšťadlo/nosič. Priemerná hodnota SI kontrolných skupín, ktorým sa podával nosič, je potom 1. Pri použití metódy spojenej pokusnej skupiny sa SI získa vydelením hodnoty spojeného rádioaktívneho začlenenia v každej pokusnej skupine hodnotou začlenenia v spojenej kontrolnej skupine s nosičom; a tým sa získa priemerná hodnota SI.

33. V rozhodovacom procese sa za pozitívny výsledok považuje stimulačný index ≥ 3. Pri určovaní toho, či je hraničný výsledok pozitívny, sa však môže použiť aj sila odozvy na dávku, štatistický význam a konzistentnosť odoziev na rozpúšťadlo/nosič a odoziev na pozitívnu kontrolu (4), (5), (6).

34. Ak je potrebné vysvetliť získané výsledky, pozornosť by sa mala venovať rôznym vlastnostiam testovanej látky vrátane toho, či má štrukturálny vzťah k látkam, ktoré sú známymi senzibilizátormi kože, či spôsobuje nadmerné lokálne podráždenie kože, a charakteru pozorovanej odozvy na dávku. Tieto a ostatné hľadiská sa podrobne rozoberajú inde (7).

35. Zbieranie údajov o rádioaktivite na úrovni jednotlivých myší umožní vykonať štatistickú analýzu prítomnosti a úrovne vzťahu medzi dávkou a odozvou. Každé štatistické posúdenie by mohlo zahŕňať hodnotenie vzťahu medzi dávkou a odozvou, ako aj vhodne upravené porovnávania pokusných skupín (napr. porovnávania v pároch skupiny, ktorej sa podáva dávka, a súbežnej kontrolnej skupiny s nosičom). Štatistické analýzy môžu zahŕňať napr. lineárnu regresiu alebo Williamsov test na posúdenie trendov vo vzťahu medzi dávkou a odozvou a Dunnettov test na porovnávanie v pároch. Pri výbere vhodnej metódy štatistickej analýzy by si výskumný pracovník mal uvedomovať možné nerovnosti rozdielov a ďalšie súvisiace problémy, ktoré si môžu vyžadovať premenu údajov alebo štatistickú analýzu založenú na iných ako parametrických údajoch. Výskumný pracovník bude možno v každom prípade musieť vykonať výpočty SI a štatistické analýzy s určitými dátovými bodmi a bez nich (niekedy sa tieto údaje nazývajú „extrémne hodnoty“).

▼M3

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

36. Údaje by sa mali uvádzať v tabuľkovej podobe. Pri použití metódy jednotlivých zvierat sa v tabuľke uvedú hodnoty DPM u jednotlivých zvierat, skupinová priemerná hodnota DPM/zviera, súvisiaci rozsah chyby (napr. SD, SEM) a priemerná hodnota SI každej dávkovej skupiny v porovnaní so súbežnou kontrolnou skupinou s nosičom. Pri použití metódy spojenej pokusnej skupiny sa v tabuľke uvedie priemerná/prostredná hodnota DPM a priemerná hodnota SI každej dávkovej skupiny v porovnaní so súbežnou kontrolnou skupinou s nosičom.

Správa o teste

37. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testované a kontrolné látky:

— identifikačné údaje (napr. čísla CAS, čísla EC, ak sú k dispozícii, zdroj, čistota; známe nečistoty, číslo šarže),

— fyzikálny charakter a fyzikálno-chemické vlastnosti (napr. prchavosť, stabilita, rozpustnosť),

— v prípade zmesi zloženie a relatívny percentuálny podiel zložiek.

Rozpúšťadlo/nosič:

— identifikačné údaje (čistota, v prípade potreby koncentrácia, použitý objem),

— zdôvodnenie voľby nosiča.

Testovacie zvieratá:

— použitý kmeň myší CBA,

— mikrobiologický stav zvierat, ak je známy,

— počet a vek zvierat,

— zdroj zvierat, podmienky umiestnenia, krmivo atď.

Podmienky testu:

— informácie o príprave a aplikácii testovanej látky,

— zdôvodnenie výberu dávky (vrátane výsledkov z predbežného skríningového testu, ak sa uskutočnil),

— použité koncentrácie nosiča a testovanej látky a celkové množstvo aplikovanej testovanej látky,

— údaje o kvalite krmiva a vody (vrátane druhu/zdroja krmiva, zdroja vody),

— podrobný opis harmonogramu podávania dávok a odberu vzoriek,

— metódy merania toxicity,

— kritériá na hodnotenie štúdií ako pozitívnych alebo negatívnych,

— informácie o akýchkoľvek odchýlkach od protokolu a vysvetlenie, ako odchýlky ovplyvňujú návrh a výsledky štúdie.

Kontrola spoľahlivosti:

— súhrn výsledkov poslednej kontroly spoľahlivosti vrátane informácií o testovanej látke, koncentrácii a použitom nosiči,

— údaje o súbežnej a/alebo historickej pozitívnej kontrole a súbežnej negatívnej kontrole testovacieho laboratória,

▼**M3**

— ak nebola zahrnutá súbežná pozitívna kontrola, dátum a laboratórna správa o najaktuálnejšej periodickej pozitívnej kontrole a správa s historickými údajmi o pozitívnej kontrole, ktorými laboratórium zdôvodňuje nevykonanie súbežnej pozitívnej kontroly.

Výsledky:

— hmotnosti jednotlivých myší na začiatku podávania dávky a pri naplánovanom usmrtení, ako aj priemerný a súvisiaci rozsah chyby (napr. SD a SEM) pre každú pokusnú skupinu,

— časový priebeh nástupu príznakov toxicity u každého zvieraťa vrátane podráždenia kože na mieste podania látky, ak sa vyskytnú,

— tabuľka hodnôt DPM a SI u jednotlivých myší (metóda jednotlivých zvierat) alebo priemerných/prostredných hodnôt DPM a SI (metóda spojenej pokusnej skupiny) v každej pokusnej skupine,

— priemerný a súvisiaci rozsah chyby (napr. SD, SEM) v súvislosti s hodnotou DPM/myš v každej pokusnej skupine a výsledky analýzy extrémnej hodnoty v každej pokusnej skupine pri použití metódy jednotlivých zvierat,

— výpočet SI a vhodná miera variability, ktorá berie do úvahy variabilitu medzi zvieratami v skupinách, ktorým sa podáva testovaná látka, a v kontrolných skupinách pri použití metódy jednotlivých zvierat,

— vzťah medzi dávkou a odozvou,

— v prípade potreby štatistické analýzy.

Rozbor výsledkov:

— stručný komentár v súvislosti s výsledkami, analýza odozvy na dávku, štatistické analýzy, ak existujú, s uvedením záveru, či by sa testovaná látka mala považovať za látku spôsobujúcu senzibilizáciu kože.

LITERATÚRA

1. OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. K dispozícii na stránke: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

2. Kimber, I. and Basketter, D. A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol.*, 30, 165 – 169.

3. Kimber, I., Dearman, R. J., Scholes, E. W. and Basketter, D. A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol.*, 93, 13 – 31.

4. Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R. J., Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Basketter, D. A., Lea, L., House, R. V., Ladies, G. S., Loveless, S. E. and Hastings, K. L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Healt.*, 53, 563 – 579.

5. Chamberlain, M. and Basketter, D. A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999 – 1002.

6. Basketter, D. A., Gerberick, G. F., Kimber, I. and Loveless, S. E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985 – 997.

7. Basketter, D. A., Gerberick, G. F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327 – 333.

▼M3

8. Van Och, F. M. M., Slob, W., De Jong, W. H., Vandebriel, R. J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol.*, 146, 49 – 59.

9. Dean, J. H., Twerdok, L. E., Tice, R. R., Sailstad, D. M., Hattan, D. G., Stokes, W. S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmaco.*, 34, 258 – 273.

10. Haneke, K. E., Tice, R. R., Carson, B. L., Margolin, B. H., Stokes, W. S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmaco.*, 34, 274 – 286.

11. Sailstad, D. M., Hattan, D., Hill, R. N., Stokes, W. S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmaco.*, 34, 249 – 257.

12. ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozícii na stránke: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf].

13. OECD (1992), *Skin Sensitisation*. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 406, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

14. OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

15. Dearman, R. J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D. A. and Kimber, I. (1998), Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde, *J. Appl. Toxicol.*, 18, 281 – 284.

16. Kimber, I., Dearman, R. J., Betts, C. J., Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Kern, P. S., Patlewicz, G. Y. and Basketter, D. A. (2006), The local lymph node assay and skin sensitisation: a cut-down screen to reduce animal requirements? *Contact Dermatitis*, 54, 181 – 185.

17. ESAC (2007), Statement on the Reduced Local Lymph Node Assay (rLLNA), European Commission Directorate General, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection, European Centre for the Validation of Alternative Methods, April 2007. K dispozícii na stránke: [http://ecvam.jrc.it/ft_doc/ESAC26_statement_rLLNA_20070525-1.pdf].

18. ICCVAM (2009), The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) Test Method Evaluation Report. The Reduced Murine Local Lymph Node Assay: An Alternative Test Method Using Fewer Animals to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products, NIH Publication Number 09-6439, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozícii na stránke: [http://iccvam.niehs.nih.gov/].

19. ICCVAM (1999), The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds, The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM), NIH Publication No 99-4494, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozícii na stránke: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf].

▼M3

20. Kreiling, R., Hollnagel, H. M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M. S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT), Food Chem. Toxicol., 46, 1896 – 1904.

21. Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J. C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH, Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90 – 96.

22. ICCVAM (2009), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Assessment of the Validity of the LLNA for Testing Pesticide Formulations and Other Products, Metals, and Substances in Aqueous Solutions, NIH Publication Number 10-7512, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozícii na stránke: [http://iccvam.niehs.nih.gov/].

23. ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

24. McGarry, H. F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH, Toxicol., 238, 71 – 89.

25. OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No 404, Paris, France. K dispozícii na stránke: http://www.oecd.org/document/40/0,3343,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html].

26. Reeder, M. K., Broomhead, Y. L., DiDonato, L. and DeGeorge, G. L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances, Toxicologist, 96, 235.

27. ICCVAM (2009), Non-radioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozícii na stránke: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

28. Hayes, B. B., Gerber, P. C., Griffey, S. S. and Meade, B. J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, Drug. Chem. Toxicol., 21, 195 – 206.

29. Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H. C., Ruzicka, T., Ahr, H. J., Lehmann, P. and Vohr, V. W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83 – 94.

30. Woolhiser, M. R., Hayes, B. B. and Meade, B. J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth.*, 8, 245 – 256.

31. Hayes, B. B. and Meade, B. J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491 – 506.

32. Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A. O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H. W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60 – 68.

33. Vohr, H. W. and Ahr, H. J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721 – 728.

34. Patterson, R. M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023 – 1028.

35. OECD (1987), *Acute Dermal Toxicit.*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. K dispozícii na stránke: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

▼**M3**

36. ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing In Vitro Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozícii na stránke: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

37. OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluatio.*, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

▼M3

Dodatok 1

Normy výkonnosti na posudzovanie navrhovaných podobných alebo upravených testovacích metód LLNA na senzibilizáciu kože

ÚVOD

1. Cieľom noriem výkonnosti (PS) je oznámiť základ, na ktorom možno určiť, že nové testovacie metódy, či už chránené (t. j. chránené autorským právom, obchodnou značkou, registrované), alebo nechránené, sú dostatočne presné a spoľahlivé na konkrétne účely testovania. Tieto normy výkonnosti sú založené na validovaných a akceptovaných testovacích metódach a možno ich použiť na hodnotenie spoľahlivosti a presnosti ďalších podobných metód (hovorovo nazývaných testy „me-too“), ktoré sú založené na podobných vedeckých zásadách a merajú alebo prognózujú rovnaký biologický alebo toxický účinok (14).

2. Pred prijatím upravených metód (t. j. navrhnutých potenciálnych zlepšení schválenej testovacej metódy) je potrebné vykonať hodnotenie s cieľom určiť účinok navrhnutých zmien na výkonnosť testu a rozsah, v akom takéto zmeny ovplyvňujú informácie dostupné pre ďalšie zložky procesu validácie. V závislosti od počtu a povahy navrhovaných zmien, získaných údajov a sprievodnej dokumentácie k týmto zmenám by sa na ne mal vzťahovať buď rovnaký proces validácie, akým prechádza nový test, alebo prípadne obmedzené posúdenie spoľahlivosti a relevantnosti na základe zavedených noriem výkonnosti (14).

3. Podobné alebo upravené metódy navrhnuté na použitie v tejto testovacej metóde by sa mali posúdiť s cieľom určiť ich spoľahlivosť a presnosť pri použití chemikálií, ktoré zastupujú celý rozsah hodnotení LLNA. S cieľom zabrániť neoprávnenému použitiu zvierat sa dôrazne odporúča, aby tvorcovia modelov konzultovali s príslušnými orgánmi pred začatím validačných štúdií v súlade s normami výkonnosti a usmernením uvedeným v tejto testovacej metóde.

4. Tieto normy výkonnosti sú založené na zosúladených normách výkonnosti amerického medziagentúrneho koordinačného výboru pre validáciu alternatívnych metód (US-ICCVAM), Európskeho centra pre validáciu alternatívnych metód (ES-ECVAM) a japonského centra pre validáciu alternatívnych metód (JaCVAM) (12), na základe ktorých sa hodnotí platnosť podobných alebo upravených verzií LLNA. Do noriem výkonnosti patria nevyhnutné zložky testovacej metódy, odporúčané referenčné chemikálie a normy presnosti a spoľahlivosti, ktoré by navrhnutá metóda mala dosiahnuť alebo presiahnuť.

I. **Nevyhnutné zložky testovacej metódy**

5. S cieľom zabezpečiť, že podobná alebo upravená metóda LLNA bude z funkčného a mechanického hľadiska podobná metóde LLNA a bude merať rovnaký biologický účinok, do protokolu testovacej metódy by sa mali zahrnúť tieto zložky:

   — Testovacia látka by sa mala lokálne aplikovať na obe uši myši.

   — Proliferácia lymfocytov by sa mala merať v lymfatickej uzline v drénovanom mieste aplikácie testovanej látky.

   — Proliferácia lymfocytov by sa mala merať počas indukčnej fázy senzibilizácie kože.

▼M3

— Zvolená najvyššia dávka testovanej látky by mala obsahovať maximálnu koncentráciu látky, ktorá nespôsobuje systémovú toxicitu a/ani nadmerné lokálne podráždenie kože myši. Najvyššia dávka pozitívnych referenčných chemikálií by mala byť prinajmenšom taká vysoká ako hodnoty LLNA EC3 zodpovedajúcich referenčných chemikálií (pozri tabuľku 1), ktoré nespôsobujú systémovú toxicitu a/ani nadmerné lokálne podráždenie kože myši.

— Každá štúdia by mala obsahovať súbežnú kontrolnú skupinu, ktorej sa podáva nosič, a v prípade potreby by sa mala použiť aj súbežná pozitívna kontrola.

— V skupine, ktorej sa podáva dávka, by mali byť minimálne štyri zvieratá.

— Možno zbierať údaje o jednotlivých zvieratách alebo spojené údaje o zvieratách.

Ak nebude splnené niektoré z týchto kritérií, potom tieto normy výkonnosti nemožno použiť na validáciu podobnej alebo upravenej metódy.

II. **Minimálny zoznam referenčných látok**

6. Zosúladené normy výkonnosti US-ICCVAM, ES-ECVAM a japonského JaCVAM (12) identifikovali 18 minimálnych referenčných chemikálií, ktoré by sa mali použiť, a štyri nepovinné referenčné chemikálie [t. j. látky, s ktorými sa v LLNA dosiahli falošné pozitívne alebo falošné negatívne výsledky v porovnaní s výsledkami, ktoré sa dosiahli u ľudí a morčiat (B.6 alebo usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (13), a preto poskytujú príležitosť na dosiahnutie rovnakej alebo lepšej výkonnosti ako LLNA], ktoré sú zahrnuté do noriem výkonnosti LLN. Kritériá výberu na identifikáciu týchto chemikálií boli:

— zoznam referenčných chemikálií zastupujúcich druhy látok, ktoré sa zvyčajne testujú v súvislosti s ich potenciálom spôsobiť senzibilizáciu kože, a rozsah odoziev, ktoré LLNA dokáže merať alebo prognózovať,

— látky mali dobre vymedzené chemické štruktúry,

— pre každú látku boli dostupné údaje z LLNA testov na morčatách (t. j. B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (13) a (ak existujú) údaje z testov na ľuďoch a

— látky boli ľahko dostupné z komerčného zdroja.

Odporúčané referenčné chemikálie sú uvedené v tabuľke 1. Štúdie, v ktorých sa používajú navrhnuté referenčné chemikálie, by sa mali hodnotiť v nosiči, s ktorým sú uvedené v tabuľke 1. V situáciách, keď uvedená látka nie je dostupná, môžu sa použiť iné látky, ktoré spĺňajú uvedené kritériá výberu, a tento výber sa musí dostatočne zdôvodniť.

▼M3

Tabuľka 1

Odporúčané referenčné chemikálie pre normy výkonnosti LLNA

Číslo	Chemikálie ([1])	Číslo CAS	Forma	Nosič ([2])	EC3 % ([3])	P ([4])	0,5x – 2,0x EC3	Skutočný rozsah EC3	LLNA/morča	LLNA/ človek
1.	5-chlór-2-metyl-4-izotiazolín-3-ón (CMI)/ 2-metyl-4-izotiazolín-3-ón (MI) ([5])	26172-55-4/2682-20-4	kvap.	DMF	0,009	1	0,0045 – 0,018	NC	+/+	+/+
2.	DNCB	97-00-7	tuhá	AOO	0,049	15	0,025 – 0,099	0,02 – 0,094	+/+	+/+
3.	4-fenyléndiamín	106-50-3	tuhá	AOO	0,11	6	0,055 – 0,22	0,07 –0,16	+/+	+/+
4.	chlorid kobaltnatý	7646-79-9	tuhá	DMSO	0,6	2	0,3 –1,2	0,4 – 0,8	+/+	+/+
5.	izoeugenol	97-54-1	kvap.	AOO	1,5	47	0,77 – 3,1	0,5 – 3,3	+/+	+/+
6.	2-merkaptobenzotiazol	149-30-4	tuhá	DMF	1,7	1	0,85 – 3,4	NC	+/+	+/+
7.	citral	5392-40-5	kvap.	AOO	9,2	6	4,6 – 18,3	5,1 – 13	+/+	+/+
8.	HCA	101-86-0	kvap.	AOO	9,7	21	4,8 – 19,5	4,4 – 14,7	+/+	+/+
9.	eugenol	97-53-0	kvap.	AOO	10,1	11	5,05 – 20,2	4,9 – 15	+/+	+/+
10.	fenyl-benzoát	93-99-2	tuhá	AOO	13,6	3	6,8 – 27,2	1,2 – 20	+/+	+/+
11.	škoricový alkohol	104-54-1	tuhá	AOO	21	1	10,5 – 42	NC	+/+	+/+
12.	imidazolidinyl močovina	39236-46-9	tuhá	DMF	24	1	12 – 48	NC	+/+	+/+
13.	metyl-metakrylát	80-62-6	kvap.	AOO	90	1	45 – 100	NC	+/+	+/+
14.	chlórbenzén	108-90-7	kvap.	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
15.	izopropanol	67-63-0	kvap.	AOO	50	1	NA	NA	–/–	–/+

▼M3

Číslo	Chemikálie (1)	Číslo CAS	Forma	Nosič (2)	EC3 % (3)	P (4)	0,5x – 2,0x EC3	Skutočný rozsah EC3	LLNA/morča	LLNA/ človek
16.	kyselina mliečna	50-21-5	kvap.	DMSO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
17.	metyl salicylát	119-36-8	kvap.	AOO	20	9	NA	NA	–/–	–/–
18.	kyselina salicylová	69-72-7	tuhá	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/–
Nepovinné látky na preukázanie lepšej výkonnosti vo vzťahu k LLNA										
19.	laurylsulfát sodný	151-21-3	tuhá	DMF	8,1	5	4,05 – 16,2	1,5 – 17,1	+/–	+/–
20.	etylénglykol dimetakrylát	97-90-5	kvap.	MEK	28	1	14 – 56	NC	+/–	+/+
21.	xylén	1330-20-7	kvap.	AOO	95,8	1	47,9 – 100	NC	+/ (**)	+/–
22.	chlorid nikelnatý	7718-54-9	tuhá	DMSO	5	2	NA	NA	–/+	–/+

Skratky: AOO = acetón: olivový olej (4: 1, objemové percentá); číslo CAS = Chemical Abstracts Service Number; DMF = *N,N*-dimetylformamid; DMSO = dimetylsulfoxid; DNCB = 2,4-dinitrochlórbenzén; EC3 = odhadovaná koncentrácia, ktorá je potrebná na dosiahnutie stimulačného indexu 3; morča = výsledok testu s morčaťom (t. j. B.6 alebo usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (13); HCA = 3-fenyl-2-hexylpropanál; kvap. = kvapalná forma; LLNA = výsledok lokálnej skúšky lymfatických uzlín myší (t. j. B.42 alebo usmernenie OECD na vykonávanie testov 429) (1); MEK = metyletyl ketón; NA = neuplatňuje sa, pretože stimulačný index je nižší ako 3; NC = nie je vypočítaný, pretože údaje boli získané z jedinej štúdie; tuhá = tuhá forma látky; nosič = testovaný nosič.

(*) Považuje sa za látku, ktorá nespôsobuje senzibilizáciu kože u ľudí vzhľadom na skutočnosť, že v klinických náplasťových testoch neboli zistené žiadne výsledky, látka nie je súčasťou náplasťových testov ako jeden z alergénov a neboli zistené žiadne prípady senzibilizácie u ľudí.

(**) Údaje z testov s morčatami nie sú dostupné.

(1) Chemikálie by sa mali pripravovať každý deň okrem prípadu, keď údaje o stabilite preukazujú prijateľnosť uskladnenia.

(2) Vzhľadom na pravdepodobný vplyv rôznych nosičov na výkonnosť LLNA by sa mal pre každú referenčnú chemikáliu použiť odporúčaný nosič (24) (32).

(3) Priemerná hodnota sa používa v prípade, že je k dispozícii viac ako jedna hodnota EC3. Pri negatívnych látkach (t. j. so stimulačným indexom < 3) sa vyjadruje najvyššia testovaná koncentrácia.

(4) Počet štúdií LLNA, z ktorých boli získané údaje.

(5) Komerčne dostupné ako Kathon CG (číslo CAS 55965-84-9), čo je zmes CMI a MI v pomere 3: 1. Relatívne koncentrácie každej zložky sa pohybujú v rozmedzí od 1,1 % do 1,25 % (CMI) a od 0,3 % do 0,45 % (MI). Neaktívne zložky sú magnéziové soli (21,5 % až 24 %) a dusičnan meďnatý (0,15 % až 0,17 %), pričom zvyšok tvorí 74 % až 77 % vody. Kathon CG je k dispozícii prostredníctvom spoločnosti Sigma-Aldrich a Rohm and Haas (teraz sa spoločnosť nazýva Dow Chemical Corporation).

▼M3

III. **Vymedzené normy spoľahlivosti a presnosti**

7. Presnosť podobnej alebo upravenej metódy LLNA by mala splniť alebo presiahnuť výkonnostnú normu LLNA, ak sa posudzuje s použitím minimálne 18 referenčných chemikálií, ktoré sa majú použiť. Nová alebo upravená metóda by mala viesť k správnej klasifikácii založenej na rozhodovaní typu „áno/nie“. Nová alebo upravená metóda však nemusí správne klasifikovať všetky minimálne referenčné chemikálie, ktoré sa majú použiť. Ak bol napríklad jeden zo slabých senzibilizátorov nesprávne klasifikovaný, na preukázanie rovnakej výkonnosti by sa mohla zvážiť možnosť zdôvodniť túto nesprávnu klasifikáciu a poskytnúť ďalšie primerané údaje (napr. výsledky testov, ktoré správne klasifikujú ostatné látky s podobnými fyzikálnymi, chemickými a senzibilizačnými vlastnosťami, aké majú tie látky, ktoré boli nesprávne klasifikované). Za týchto okolností by sa stav validácie novej alebo upravenej testovacej metódy LLNA posudzoval od prípadu k prípadu.

Vnútrolaboratórna reprodukovateľnosť

8. Na určenie vnútrolaboratórnej reprodukovateľnosti by sa nová alebo upravená metóda LLNA mala posudzovať s použitím senzibilizujúcej látky, ktorá je v LLNA dobre charakterizovaná. Preto sú normy výkonnosti LLNA založené na variabilite výsledkov z opakovaných testov s 3-fenyl-2-hexylpropanálom (HCA). Na posúdenie vnútrolaboratórnej spoľahlivosti by sa prahové hodnoty odhadovanej koncentrácie (ECt) HCA mali určiť pri štyroch osobitných príležitostiach, pričom medzi jednotlivými testami je časový rozdiel aspoň jeden týždeň. Prijateľnú vnútrolaboratórnu reprodukovateľnosť indikuje schopnosť laboratória získať v každom teste s HCA hodnoty ECt medzi 5 % a 20 %, čo predstavuje rozsah 0,5 – 2,0-násobku priemernej hodnoty EC3 definovanej pre HCA (10 %) v LLNA (pozri tabuľku 1).

Medzilaboratórna reprodukovateľnosť

9. Medzilaboratórna reprodukovateľnosť novej alebo upravenej metódy LLNA by sa mala posudzovať s použitím dvoch senzibilizujúcich látok, ktoré sú v LLNA dobre charakterizované. Normy výkonnosti LLNA sú založené na variabilite výsledkov testov s HCA a 2,4-dinitrochlórbenzénom (DNCB) v rôznych laboratóriách. Hodnoty ECt by sa mali určiť nezávisle z jednej štúdie vykonanej minimálne v troch rôznych laboratóriách. Na preukázanie prijateľnej medzilaboratórnej reprodukovateľnosti by každé laboratórium malo získať hodnoty ECt medzi 5 % a 20 % pri HCA a 0,025 % až 0,1 % pri DNCB, čo predstavuje rozsah 0,5 – 2,0-násobku priemerných koncentrácií EC3 definovaných pre HCA (10 %) a DNCB (0,05 %) v LLNA (pozri tabuľku 1).

▼M3

Dodatok 2

Vymedzenie pojmov

Presnosť: Miera zhody výsledkov testovacej metódy s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o opatrenie výkonnosti testovacej metódy a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa ako synonymum s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy (14).

Referenčná látka: Látka spôsobujúca alebo nespôsobujúca senzibilizáciu, ktorá sa používa ako štandardná látka na porovnávanie s testovanou látkou. Referenčná látka by mala mať tieto vlastnosti: i) konzistentný(-é) a spoľahlivý(-é) zdroj(-e); ii) štrukturálnu a funkčnú podobnosť s triedou látok, ktoré sa budú testovať; iii) známe fyzikálno-chemické vlastnosti; iv) podporné údaje o známych účinkoch a v) známu potenciu v rozsahu želanej odozvy.

Prahová hodnota odhadovanej koncentrácie (ECt): Odhadovaná koncentrácia testovanej látky potrebná na dosiahnutie stimulačného indexu, ktorý naznačuje pozitívnu odozvu.

Odhadovaná koncentrácia tri (EC3): Odhadovaná koncentrácia testovanej látky potrebná na dosiahnutie stimulačného indexu 3.

Falošný negatívny výsledok: Testovaná látka je testovanou metódou nesprávne identifikovaná ako negatívna alebo neaktívna, pričom v skutočnosti je pozitívna alebo aktívna.

Falošný pozitívny výsledok: Testovaná látka je testom nesprávne identifikovaná ako pozitívna alebo aktívna, pričom v skutočnosti je negatívna alebo neaktívna.

Nebezpečnosť: Potenciál škodlivého účinku na zdravie alebo životné prostredie. Škodlivý účinok sa prejavuje až pri dostatočnej hladine expozície.

Medzilaboratórna reprodukovateľnosť: Miera, do akej rôzne kvalifikované laboratóriá, ktoré používajú rovnaký protokol a testujú rovnaké testovacie látky, dokážu dosiahnuť kvalitatívne a kvantitatívne podobné výsledky. Medzilaboratórna reprodukovateľnosť sa určuje počas postupov pred validáciou a v rámci postupov validácie a znamená mieru, do akej možno test úspešne prenášať medzi laboratóriami. Takisto je známa ako reprodukovateľnosť medzi laboratóriami (14).

Vnútrolaboratórna reprodukovateľnosť: Určenie miery, do akej kvalifikovaní pracovníci v rámci jedného laboratória dokážu úspešne opakovať výsledky s použitím konkrétneho protokolu v rôznom čase. Takisto je známa ako reprodukovateľnosť v rámci laboratória (14).

Test me-too: Hovorový názov testovacej metódy, ktorá je štrukturálne a funkčne podobná validovanej a akceptovanej referenčnej testovacej metóde. Takáto testovacia metóda by bola kandidátom na ďalšiu validáciu. Môže sa používať namiesto podobnej testovacej metódy (14).

Extrémna hodnota: Extrémna hodnota je pozorovanie, ktoré je značne odlišné od ostatných hodnôt v náhodnej vzorke z populácie.

▼M3

Normy výkonnosti (PS): Normy založené na validovanej testovacej metóde, ktoré slúžia ako základ na hodnotenie porovnateľnosti navrhovanej testovacej metódy, ktorá je funkčne a mechanicky podobná. Patria sem: i) nevyhnutné zložky testovacej metódy; ii) minimálny zoznam referenčných chemikálií vybraných spomedzi látok používaných na preukázanie prijateľnej výkonnosti validovanej testovacej metódy a iii) porovnateľné úrovne presnosti a spoľahlivosti založené na tom, čo sa získalo pre validovanú testovaciu metódu a čo by navrhovaná testovacia metóda mala preukázať pri hodnotení pomocou minimálneho zoznamu referenčných chemikálií (14).

Chránená testovacia metóda: Testovacia metóda, ktorej výrobu a distribúciu obmedzujú patenty, autorské práva, obchodné značky atď.

Zabezpečovanie kvality: Riadiaci proces, v ktorom jednotlivci nezávislí od osôb vykonávajúcich testy posudzujú súlad s laboratórnymi testovacími normami, požiadavkami a postupmi vedenia záznamov, ako aj presnosť prenosu údajov.

Referenčné chemikálie: Chemikálie vybrané na použitie v procese validácie, pre ktoré už sú známe odozvy v referenčnom testovacom systéme *in vitro* alebo *in vivo* alebo odozvy u daných druhov zvierat. Tieto chemikálie by mali byť zástupcami tried chemikálií, v súvislosti s ktorými sa očakáva použitie testovacej metódy, a mali by zastupovať celý rozsah odoziev od silných po slabé alebo negatívne odozvy, ktoré možno očakávať od chemikálií, pri ktorých sa môže metóda použiť. Rôzne skupiny referenčných chemikálií sa môžu vyžadovať v rôznych štádiách procesu validácie a pre rôzne testovacie metódy a použitia testov (14).

Relevantnosť: Opis vzťahu testu k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej test správne meria alebo prognózuje biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) testovacej metódy (14).

Spoľahlivosť: Meria rozsah, v rámci ktorého sa môže testovacia metóda počas istého časového obdobia opakovane vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Posudzuje sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti (14).

Senzibilizácia kože: Imunologický proces, ku ktorému dochádza po lokálnom vystavení náchylného jednotlivca chemickému alergénu, ktorý vyvoláva kožnú imunitnú odozvu, ktorá môže viesť k vytvoreniu kontaktnej senzibilizácie.

Stimulačný index (SI): Hodnota vypočítaná na posúdenie potenciálu testovanej látky spôsobiť senzibilizáciu kože; ide teda o pomer proliferácie v pokusných skupinách a proliferácie v súbežných kontrolných skupinách, ktorým sa podáva nosič.

Testovaná látka (tiež sa nazýva testovaná chemikália): Akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Validovaná testovacia metóda: Testovacia metóda, v súvislosti s ktorou sa ukončili validačné štúdie na stanovenie relevantnosti (vrátane presnosti) a spoľahlivosti na konkrétny účel. Je dôležité poznamenať, že validovaná testovacia metóda nemusí mať dostatočnú výkonnosť, pokiaľ ide o presnosť a spoľahlivosť, aby bola prijateľná pre navrhovaný účel (14).

▼B

B.43. ŠTÚDIA NEUROTOXICITY U HLODAVCOV

1. METÓDA

Táto metóda je rovnocenná s OECD TG 424 (1997).

Táto testovacia metóda bola vyvinutá na získanie informácií, ktoré sú potrebné na potvrdenie potenciálnej neurotoxicity chemikálií u dospelých zvierat alebo jej ďalšiu charakterizáciu. Môže sa buď kombinovať s existujúcimi testovacími metódami pre štúdie toxicity pri opakovanej dávke, alebo sa môže vykonať ako samostatná štúdia. Pri plánovaní štúdií, ktoré sú založené na tejto testovacej metóde, sa odporúča, aby sa na pomoc nahliadlo do OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods (1). Toto je dôležité najmä, keď sa zvažujú modifikácie vyšetrení a testovacích postupov odporúčaných pre bežné používanie tejto metódy. The Guidance Document bol pripravený, aby uľahčil výber iných testovacích postupov na použitie za špecifických podmienok.

Posúdenie vývojovej neurotoxicity nie je predmetom tejto metódy.

1.1. ÚVOD

Pri posudzovaní a hodnotení toxických vlastností chemikálií je dôležité posúdiť potenciál vyvolať neurotoxické účinky. Práve testovacia metóda pre systémovú toxicitu pri opakovanej dávke zahrnuje vyšetrenia, ktoré skúmajú potenciálnu neurotoxicitu. Táto testovacia metóda sa môže použiť na zostavenie štúdie, ktorou sa získajú alebo potvrdia ďalšie informácie o neurotoxických účinkoch v štúdiách systémovej toxicity pri opakovanej dávke. Posúdenie potenciálnej neurotoxicity určitých tried chemikálií by však mohlo viesť k tomu, že sa môžu lepšie posudzovať s použitím tejto metódy bez predchádzajúcej indikácie potenciálnej neurotoxicity zo štúdií systémovej toxicity pri opakovanej dávke. Takéto posudzovanie zahrnuje napríklad:

— pozorovanie neurologických príznakov alebo neuropatologických lézií v iných štúdiách toxicity ako sú štúdie systémovej toxicity pri opakovanej dávke, alebo

— štrukturálnu príbuznosť alebo iné informácie, ktoré ich spájajú so známymi neurotoxikantami.

Okrem toho sa môžu vyskytnúť aj iné príklady, keď je vhodné použitie tejto testovacej metódy; ďalšie informácie pozri v odkaze (1).

Táto metóda bola vyvinutá tak, aby sa dala prispôsobiť osobitným potrebám na potvrdenie špecifickej histopatologickej a behaviorálnej neurotoxicity chemikálie, ako aj na umožnenie charakterizácie a kvantifikácie neurotoxických reakcií. V minulosti sa neurotoxicita stotožňovala s neuropatiou, ktorá zahrnuje neuropatologické lézie alebo neurologické dysfunkcie, ako sú záchvat, paralýza alebo triaška.

▼B

Aj keď neuropatia je dôležitým prejavom neurotoxicity, teraz je zrejmé, že existuje mnoho ďalších príznakov nervovej systémovej toxicity (napr. strata motorickej koordinácie, senzorické deficity, dysfunkcie týkajúce sa schopnosti sa učiť a pamäte), ktoré sa nemôžu prejaviť v štúdiách neuropatie alebo iných typoch štúdií.

Táto testovacia metóda na dôkaz neurotoxicity je vyvinutá na stanovenie hlavných neurobehaviorálnych a neuropatologických účinkov u dospelých hlodavcov. Hoci účinky na správanie, aj keď pri neprítomnosti morfologických zmien, môžu odrážať nepriaznivý vplyv na organizmus, nie všetky zmeny v správania sú špecifické pre nervový systém. Preto je potrebné všetky pozorované zmeny hodnotiť v súvislosti s korelačnými histopatologickými, hematologickými alebo biochemickými údajmi, ako aj údajmi o iných typoch systémovej toxicity. Testovanie uvádzané v tejto metóde na umožnenie charakterizácie a kvantifikácie neurotoxických reakcií zahrnuje špecifické histopatologické a behaviorálne postupy, ktoré sa môžu ďalej opierať o elektrofyziologické a/alebo biochemické vyšetrenia (1), (2), (3), (4).

Neurotoxikanty môžu pôsobiť na množstvo cieľov v nervovom systéme a rozličnými mechanizmami. Keďže žiadny samostatný súbor testov nie je schopný dôkladne posúdiť neurotoxický potenciál všetkých látok, môže byť potrebné využiť iné *in vivo* alebo *in vitro* testy, ktoré sú špecifické pre zistený alebo predpokladaný typ neurotoxicity.

Táto testovacia metóda sa môže tiež použiť v spojení s usmernením uvedeným v OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Methods (1) na zostavenie štúdií určených na ďalšiu charakterizáciu alebo zvýšenie citlivosti kvantifikácie reakcie na dávku, na lepšie stanovenie hladiny bez pozorovaného nepriaznivého účinku alebo na dokázanie známych alebo podozrivých rizík chemikálie. Napríklad sa môžu zostaviť štúdie na identifikáciu a posúdenie neurotoxického(-ých) mechanizmu(-ov) alebo na doplnenie údajov, ktoré sú už k dispozícii z použitých základných neurobehaviorálnych a neuropatologických vyšetrovacích postupov. Takéto štúdie nevyžadujú opakované údaje, ktoré by sa získali na základe použitia štandardných postupov odporúčaných v tejto metóde, ak sú už takéto údaje k dispozícii a nepokladajú sa za potrebné pre interpretáciu výsledkov štúdie.

Táto štúdia neurotoxicity, použitá samostatne alebo v kombinácii, poskytuje informácie, ktoré môžu:

— identifikovať, či nervový systém je permanentne alebo reverzibilne ovplyvnený testovanou chemikáliou,

— prispieť ku charakterizácii zmien nervového systému spojených s vystavením sa pôsobeniu chemikálie a k pochopeniu príslušného mechanizmu,

▼B

— určiť vzťahy medzi dávkou a reakciou v závislosti od času na stanovenie hladiny bez pozorovaného nepriaznivého účinku (ktorá sa môže použiť na stanovenie bezpečnostných kritérií pre chemikáliu).

Pri tejto metóde testovania sa testovaná látka podáva orálne. Iné cesty podávania (napr. dermálna alebo inhalačná) môžu byť vhodnejšie a môžu vyžadovať úpravu odporúčaných postupov. Rozhodnutie o tom akou cestou sa látka bude podávať závisí na profile expozície ľudí a na dostupných toxikologických alebo kinetických informáciách.

1.2. DEFINÍCIE

Nepriaznivý účinok: každá zmena v súvislosti s ošetrením od normálneho stavu, ktorá znižuje schopnosť organizmu prežiť, reprodukovať sa alebo prispôsobiť sa prostrediu.

Dávka: je množstvo podanej testovanej látky. Dávka sa vyjadruje ako hmotnosť (g, mg) alebo ako hmotnosť testovanej látky na jednotku hmotnosti testovaného zvieraťa (napr. mg/kg) alebo ako konštantné koncentrácie v krmive (ppm).

Dávkovanie: je všeobecný termín zahrnujúci podávanie látky, jej frekvenciu a trvanie podávania dávok.

Neurotoxicita: nepriaznivá zmena v štruktúre alebo funkcii nervového systému, ktorá vzniká v dôsledku vystavenia chemickému, biologickému alebo fyzikálnemu činiteľu.

Neurotoxikant: je každý chemický, biologický alebo fyzikálny činiteľ, ktorý môže spôsobiť neurotoxicitu.

NOAEL: je skratka pre hladinu bez pozorovaného nepriaznivého účinku a je to najvyššia dávka, pri ktorej sa nepozorujú žiadne nepriaznivé zistenia v súvislosti s ošetrením.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Testovaná chemikália sa podáva orálnou cestou v rade dávok niekoľkým skupinám laboratórnych hlodavcov. Zvyčajne sa vyžadujú opakované dávky a režim podávania dávok môže byť 28 dní, pre subchronickú (90 dní) alebo chronickú toxicitu (1 rok alebo viac). Postupy uvedené v tejto testovacej metóde sa môžu použiť aj pre štúdiu akútnej neurotoxicity. Zvieratá sa testujú na umožnenie detekcie alebo charakterizácie behaviorálnych a/alebo neurologických abnormalít. V priebehu každého obdobia pozorovania sa hodnotí rozsah behaviorálnych aspektov, ktoré by mohli byť ovplyvnené neurotoxikantami. Na konci testu sa časť zvierat každého pohlavia z každej skupiny pomocou perfúzie fixuje in situ a rezy tkaniva mozgu, miechy a periferálnych nervov sa pripravia a vyšetria.

Keď sa štúdia uskutočňuje ako samostatná štúdia na zistenie neurotoxicity alebo na charakterizáciu neurotoxických účinkov, zvieratá v každej skupine, ktoré sa nepoužili na perfúziu a následnú histopatológiu (pozri tabuľku 1), sa môžu použiť na špecifické neurobehaviorálne, neuropatologické, neurochemické alebo elektrofyziologické postupy, ktoré môžu doplniť údaje získané pri štandardných vyšetreniach vyžadovaných touto metódou (1). Tieto dodatočné postupy môžu byť osobitne užitočné, keď empirické pozorovania alebo očakávané účinky indikujú špecifický typ alebo cieľové tkanivo v prípade neurotoxicity spôsobenej chemikáliou. Alternatívne sa môžu zvyšné zvieratá použiť na také hodnotenie, ako sa vyžaduje v testovacích metódach pre štúdie toxicity pri opakovanej dávke u hlodavcov.

▼B

Ak sa postupy tejto testovacej metódy kombinujú s postupmi iných testovacích metód, je potrebný dostatočný počet zvierat na splnenie požiadaviek pre vyšetrenia v oboch štúdiách.

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Výber druhu zvierat**

Spomedzi druhov hlodavcov sa prednostne používa potkan, aj keď je možné použiť aj iný druh hlodavca. Použijú sa mladé dospelé zdravé zvieratá bežne používaných laboratórnych kmeňov. Samice by mali byť panenské a negravidné. Dávkovanie by sa malo začať čo najskôr po odstavení, pokiaľ možno nie neskôr ako vo veku šesť týždňov, a v každom prípade pred dosiahnutím deviatich týždňov. Keď sa však táto štúdia kombinuje s inými štúdiami, môže byť potrebné túto vekovú požiadavku upraviť. Na začiatku štúdie rozdiel medzi hmotnosťami použitých zvierat nemá byť vyšší ako ± 20 % priemernej hmotnosti každého pohlavia. Keď sa uskutoční predbežná krátkodobá štúdia pri opakovaných dávkach pred uskutočnením dlhodobej štúdie, je potrebné v oboch štúdiách použiť zvieratá z rovnakého kmeňa a zdroja.

1.4.2. **Podmienky pre umiestnenie a kŕmenie**

Teplota v miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 °C (± 3 °C). Aj keď relatívna vlhkosť by mala byť aspoň 30 %, a pokiaľ možno, nemala by prevyšovať 70 %, okrem obdobia počas čistenia miestnosti by mala dosahovať 50 – 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé, v rytme 12 hodín svetlo, 12 hodín tma. Je potrebné obmedziť na minimum krátkodobý silný hluk. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Výber krmiva môže byť ovplyvnený potrebou zabezpečiť vhodnú primes testovanej látky, keď sa podáva týmto spôsobom. Zvieratá môžu byť umiestnené jednotlivo alebo v malých skupinách rovnakého pohlavia v klietkach.

1.4.3. **Príprava zvierat**

Zdravé mladé zvieratá sa náhodne rozdelia do ošetrovanej a kontrolnej skupiny. Klietky sa usporiadajú tak, aby sa minimalizovali prípadné vplyvy kvôli umiestneniu klietok. Zvieratá sa jednoznačne označia a držia vo svojich klietkach aspoň (5) päť dní pred začiatkom štúdie, aby sa aklimatizovali na laboratórne podmienky.

1.4.4. **Cesta podávania a príprava dávok**

Pri tejto metóde testovania sa testovaná látka podáva výlučne orálne. Orálne podávanie môže byť cez sondu, v krmive, v pitnej vode alebo kapsulami. Iné cesty podávania (napr. dermálna alebo inhalačná) sa môžu použiť, ale môže byť potrebné upraviť odporúčané postupy. Rozhodnutie o tom akou cestou sa látka bude podávať závisí na profile expozície ľudí a dostupných toxikologických alebo kinetických informáciách. Je potrebné uviesť zdôvodnenie výberu cesty podávania, ako aj výsledné modifikácie postupov tejto testovacej metódy.

▼B

V prípade potreby sa testovaná látka môže rozpustiť alebo rozptýliť vo vhodnom nosiči. Odporúča sa, aby sa najskôr zvážilo použitie vodného roztoku/suspenzie, potom roztoku/suspenzie v oleji (napr. kukuričný olej) a nakoniec prípadného roztoku/suspenzie v inom nosiči. Toxické vlastnosti nosiča musia byť známe. Okrem toho je potrebné venovať pozornosť týmto charakteristikám nosiča: vplyv nosiča na absorpciu, distribúciu, metabolizmus alebo retenciu testovanej látky, ktoré môžu zmeniť jej toxické vlastnosti; a vplyv na spotrebu potravy alebo vody alebo nutričný stav zvierat.

1.5. POSTUPY

1.5.1. **Počet a pohlavie zvierat**

Keď sa štúdia uskutočňuje ako samostatná štúdia, je potrebné použiť aspoň 20 zvierat (10 samíc a 10 samcov) v každej dávkovej a kontrolnej skupine na vyhodnotenie klinických a funkčných vyšetrení. Aspoň päť samcov a päť samíc, vybratých z týchto 10 samcov a 10 samíc, sa pomocou perfúzie fixuje in situ a použije na podrobnú neurohistopatológiu na konci štúdie. V prípade, keď sa iba obmedzený počet zvierat v danej dávkovej skupine vyšetrí na príznaky neurotoxických účinkov, je potrebné venovať pozornosť tomu, aby sa tieto zvieratá zahrnuli k tým, ktoré boli vybraté na perfúziu. Ak sa štúdia uskutočňuje v kombinácii so štúdiou toxicity pri opakovanej dávke, použijú sa vhodné počty zvierat, aby zodpovedali cieľom oboch štúdií. Minimálny počet zvierat na skupinu pre rôzne kombinácie štúdií je uvedený v tabuľke 1. Ak sa po ošetrení plánuje predčasné usmrtenie, alebo sa plánujú skupiny na regeneráciu, aby sa pozorovala reverzibilita, pretrvávanie alebo oneskorený výskyt toxických účinkov, alebo keď sa zvažujú dodatočné vyšetrenia, potom by sa počet zvierat mal zvýšiť, aby sa zabezpečilo, že je k dispozícii potrebný počet zvierat na vyšetrenie a histopatológiu.

1.5.2. **Ošetrovaná a kontrolná skupina**

Zvyčajne sa použijú aspoň tri dávkové skupiny a kontrolná skupina, ale ak sa na základe hodnotenia ďalších údajov neočakávajú žiadne účinky pri opakovanej dávke 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň, môže sa vykonať limitný test. Ak nie sú k dispozícii vhodné údaje, môže sa vykonať štúdia na zistenie rozsahu dávkovania, aby umožnila stanoviť dávky, ktoré sa majú použiť. Okrem ošetrenia s testovanou látkou sa zvieratá v kontrolnej skupine ošetria rovnakým spôsobom ako zvieratá v pokusnej skupine. Ak sa používa nosič pri podávaní testovanej látky, kontrolná skupina dostane nosič v najvyššom používanom objeme.

1.5.3. **Kontrola spoľahlivosti**

Laboratórium, ktoré vykonáva štúdiu, predloží údaje, ktoré dokazujú jeho spôsobilosť vykonať túto štúdiu a citlivosť použitých postupov. Takéto údaje poskytnú dôkaz schopnosti zisťovať a kvantifikovať podľa potreby zmeny v rozličných konečných bodoch, odporúčaných pre pozorovanie, ako napr. autonómne príznaky, senzorická reaktivita, sila uchopenia končatín a motorická aktivita. Informácie o chemikáliách, ktoré spôsobujú rôzne typy neurotoxických reakcií a ktoré by sa mohli použiť ako pozitívne kontrolné látky je možné nájsť v odkazoch 2 až 9. Môžu sa použiť predchádzajúce údaje, ak základné aspekty experimentálnych postupov zostávajú rovnaké. Odporúča sa pravidelná aktualizácia predchádzajúcich údajov. Ak vykonávacie laboratórium zmenilo určitý základný prvok pri uskutočňovaní testu alebo postupov, je potrebné zistiť nové údaje potvrdzujúce nezmenenú citlivosť postupov.

▼B

1.5.4. **Výber dávky**

Veľkosti dávok sa zvolia na základe posúdenia každej už zistenej toxicity a dostupných kinetických údajov pre testovanú látku alebo príbuzné materiály. Najvyššia dávka sa zvolí s cieľom vyvolať neurotoxické účinky alebo jasné účinky systémovej toxicity. Potom sa klesajúca postupnosť hladín dávok zvolí tak, aby sa preukázala každá reakcia súvisiaca s dávkou a najnižšia hladina bez pozorovaného nepriaznivého účinku (NOAEL). V zásade sa hladiny dávok stanovia tak, aby sa primárne toxické účinky na nervový systém dali odlíšiť od účinkov súvisiacich so systémovou toxicitou. Intervaly dávkovania s faktorom dva až tri sú často optimálne a pridanie štvrtej pokusnej skupiny je často vhodnejšie ako používanie veľmi veľkých intervalov (napr. viac ako faktor 10) medzi dávkami. Ak existuje realistický odhad expozície ľudí, tiež sa zohľadní.

1.5.5. **Limitný test**

Ak sa na základe štúdie s jednou dávkou aspoň 1 000 mg/kg telesnej hmotnosti/deň s použitím postupov, uvedených pre túto štúdiu, nezistia žiadne pozorovateľné neurotoxické účinky a ak sa neočakáva toxicita na základe údajov o štrukturálne príbuzných látkach, potom sa môže upustiť od úplnej štúdie s použitím troch dávok. Z očakávanej expozície ľudí môže vyplývať potreba, aby sa v limitnom teste použili vyššie orálne dávky. V prípade iných druhov podávania, ako je napr. inhalácia alebo dermálna aplikácia, fyzikálno-chemické vlastností testovanej látky často môžu určovať maximálnu prípustnú úroveň expozície. Pre uskutočnenie orálnej akútnej štúdie má byť dávka pre limitný test minimálne 2 000 mg/kg.

1.5.6. **Podávanie dávok**

Zvieratám sa podáva testovaná dávka každý deň, 7 dní v týždni počas obdobia minimálne 28 dní; použitie päťdňového režimu dávkovania alebo kratšiu dobu expozície je potrebné zdôvodniť. Ak sa testovaná látka podáva cez sondu, podáva sa ako jednorazová dávka s použitím žalúdočnej sondy alebo vhodnej intubačnej kanyly. Maximálny objem kvapaliny, ktorý sa môže jednorázovo podať závisí od veľkosti pokusných zvierat. Objem nebude vyšší ako 1 ml/-100 g telesnej hmotnosti. V prípade vodných roztokov sa však môže uvážiť použitie do 2 ml/100 g telesnej hmotnosti. S výnimkou dráždivých alebo žieravých látok, ktoré zvyčajne pri vyšších koncentráciách spôsobia zhoršenie účinkov, variabilita v aplikovanom objeme sa minimalizuje tým, že sa koncentrácie upravia tak, aby sa zabezpečil stály objem vo všetkých dávkach.

Pre látky podávané v potrave alebo pitnej vode je dôležité zabezpečiť, aby množstvá použitej testovanej látky neinterferovali s normálnou výživovou a vodnou bilanciou. Keď sa testovaná látka podáva v krmive, môže sa použiť buď stála koncentrácia v krmive (ppm) alebo stála veľkosť dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť zvieraťa; iné možnosti sa musia špecifikovať. V prípade, keď sa látka podáva sondou, látka sa podáva približne v rovnaký čas každý deň a prispôsobí sa podľa potreby, aby sa zachovala stála veľkosť dávky vzhľadom na telesnú hmotnosť. Ak sa uskutoční predbežná štúdia pri opakovaných dávkach pred uskutočnením dlhodobej štúdie, je potrebné v oboch štúdiách použiť podobné krmivo. V prípade akútnych štúdií, keď nie je možná jednorazová dávka, sa dávka môže podávať v menších množstvách v priebehu maximálne 24 hodín.

▼B

1.6. POZOROVANIE

1.6.1. **Frekvencia vyšetrení a testy**

V štúdiách pri opakovaných dávkach vymedzený čas pozorovania pokrýva obdobie dávkovania. V štúdiách akútnej toxicity sa sleduje 14-denné obdobie po ošetrení. V prípade zvierat vo vedľajších skupinách, ktoré sa držia bez expozície počas obdobia po ošetrení, vymedzený čas pozorovania pokrýva aj toto obdobie.

Vyšetrenia sa uskutočnia dostatočne často, aby sa dosiahla maximálna pravdepodobnosť zistenia všetkých behaviorálnych a/alebo neurologických abnormalít. Vyšetrenia sa uskutočnia pokiaľ možno v rovnaký čas každý deň pri zohľadnení obdobia, keď sa predpokladajú maximálne účinky po dávkovaní. Frekvencia klinických vyšetrení a funkčných testov je zosumarizovaná v tabuľke 2. Ak z kinetických alebo iných údajov z predchádzajúcich štúdií vyplýva potreba použiť odlišné časové body pre vyšetrenia, testy alebo obdobia po vyšetrení, prijme sa alternatívny harmonogram, aby sa získalo maximálne množstvo informácií. Uvedie sa zdôvodnenie zmien harmonogramu.

1.6.1.1. *Pozorovania všeobecného zdravotného stavu a mortality/morbidity*

Zdravotný stav všetkých zvierat sa pozorne vyšetrí aspoň raz denne, morbidita a mortalita sa zisťuje aspoň dvakrát denne.

1.6.1.2. *Podrobné klinické vyšetrenia*

Všetky zvieratá vybraté na tento účel sa podrobne klinicky vyšetria (pozri tabuľku 1), jedenkrát pred prvou expozíciou (na umožnenie porovnaní medzi pokusnými zvieratami) a potom v rôznych intervaloch v závislosti na trvaní štúdie (pozri tabuľku 2). Podrobné klinické vyšetrenia vedľajších skupín na regeneráciu sa vykonajú na konci obdobia regenerácie. Podrobné klinické vyšetrenia sa vykonajú mimo domácej klietky v zvyčajnej vyšetrovacej miestnosti. Starostlivo sa zaznamenajú s použitím systému hodnotenia, ktorý zahrnuje kritériá alebo stupnicu hodnotenia pre každé meranie pri vyšetreniach. Použité kritériá alebo stupnice explicitne definuje testovacie laboratórium. Je potrebné vynaložiť úsilie na zabezpečenie, aby zmeny testovacích podmienok boli minimálne (nie systematicky súvisiace s ošetrením) a aby pozorovania vykonávali vyškolení pracovníci, ktorí nie sú oboznámení o prebiehajúcom ošetrení.

Odporúča sa, aby sa pozorovania vykonávali štruktúrovanej podobe, pri ktorej sa presne definované kritéria (vrátane definície normálneho „rozsahu“) systematicky uplatňujú na každé zviera v každom čase pozorovania. „Normálny rozsah“ sa príslušne zdokumentuje. Všetky pozorované príznaky sa zaznamenajú. Vždy, keď je to možné, zaznamená sa aj závažnosť pozorovaných príznakov. Klinicky sa pozorujú okrem iného zmeny na koži, srsti, očiach, slizniciach, výskyt sekrétov a sekrétov a autonómnu aktivitu (napr. slzenie, zježenie, veľkosť zreničky, nezvyčajný priebeh dýchania a/alebo dýchanie ústami, všetky nezvyčajné príznaky pri močení alebo vyprázdňovaní a bezfarebný moč).

▼B

Všetky nezvyčajné reakcie, pokiaľ ide o polohu tela, stupeň aktivity (napr. zvýšený alebo znížený záujem o preskúmanie zvyčajného priestoru) a koordinácia pohybu, sa tiež zaznamenajú. Zmeny chôdze (napr. tackavá chôdza, ataxia), poloha (napr. zhrbená) a reaktivita na zaobchádzanie, premiestnenie alebo iné podnety z prostredia, ako aj výskyt klonických alebo tonických pohybov, kŕče alebo triaška, stereotypy (napr. nadmerná starostlivosť o srsť, nezvyčajné pohyby hlavou, opakovaný beh dokola) alebo zvláštne správanie (napr. hryzenie alebo nadmerné olizovanie, sebamrzačenie, chôdza dozadu, vydávanie zvukov) alebo agresia sa zaznamenajú.

1.6.1.3. *Funkčné testy*

Podobne ako pri podrobných klinických pozorovania, uskutočnia sa funkčné testy raz pred expozíciou a opakovane potom u všetkých zvierat, vybratých na tento účel (pozri tabuľku 1). Frekvencia funkčných testov závisí aj od trvania štúdie (pozri tabuľku 2). Okrem období pozorovania, ako je uvedené v tabuľke 2, sa vykonajú funkčné vyšetrenia vedľajších regenerujúcich skupín čo možno najbližšie k času konečného usmrtenia. Funkčné testy by mali zahrnovať senzorickú reaktivitu na rôznorodé podnety [napr. sluchové, vizuálne a proprioceptívne podnety (5), (6), (7)], hodnotenie sily uchopenia končatín (8) a hodnotenie motorickej aktivity (9). Motorická aktivita sa zmeria automatickým prístrojom, ktorým je možné stanoviť poklesy aj nárasty aktivity. Ak sa použije iný definovaný systém, je potrebné, aby bol kvantitatívny a jeho citlivosť a spoľahlivosť preukázaná. Každý prístroj by mal byť testovaný, aby sa zaručila dlhodobá spoľahlivosť a porovnateľnosť prístrojov. Ďalšie údaje o postupoch, ktoré je možné použiť, sú uvedené v príslušných odkazoch. Ak neexistujú žiadne údaje (napr. štruktúrálna aktivita, epidemiologické údaje, iné toxikologické štúdie), z ktorých by vyplývali potenciálne neurotoxické účinky, je potrebné zvážiť zahrnutie špecializovanej ší ch testov citlivosti a motorickej funkcie alebo schopnosti učiť sa a pamätať si na podrobnejšie preskúmanie týchto možných účinkov. Viac informácií o špecializovanejších testoch a ich používaní sa nachádza v odkaze (1).

Vo výnimočných prípadoch sa zvieratá, ktoré vykazujú príznaky toxicity v miere, ktorá by mohla významne ovplyvniť funkčný test, môžu vylúčiť z takého testu. Uvedie sa zdôvodnenie v prípade vylúčenia zvierat z funkčného testu.

1.6.2. **Telesná hmotnosť a spotreba potravy/vody**

Pri štúdiách s trvaním do 90 dní by sa všetky zvieratá mali odvážiť aspoň raz za týždeň a spotreba potravy (spotreba vody, keď sa testovaná látka podáva cez toto médium) by sa mala zmerať aspoň raz za týždeň. Pri dlhodobých štúdiách by sa všetky zvieratá mali odvážiť aspoň raz za týždeň v prvých 13 týždňoch a potom aspoň raz za každé 4 týždne. Spotreba potravy (spotreba vody, keď sa testovaná látka podáva cez toto médium) by sa mala zmerať aspoň raz za týždeň v prvých 13 týždňoch a potom približne v trojmesačných intervaloch, pokiaľ sa nevyžaduje inak na základe zdravotného stavu alebo telesnej hmotnosti.

▼B

1.6.3. **Oftalmológia**

Pri štúdiách, ktoré trvajú viac ako 28 dní, sa oftalmologicky vyšetria s použitím oftalmoskopu, alebo porovnateľného prístroja, pred podaním testovanej látky a pri ukončení štúdie pokiaľ možno všetky zvieratá alebo aspoň zvieratá v skupinách s vysokými dávkami a kontrolných skupinách. Ak sa zistia zmeny na očiach, alebo ak je to potrebné na základe klinických príznakov, vyšetria sa všetky zvieratá. Pri dlhodobých štúdiách sa oftalmologické vyšetrenie vykoná aj po 13 týždňoch. Oftalomologické vyšetrenia nieje potrebné vykonať, ak sú už tieto údaje dostupné z iných štúdií, ktoré majú podobné trvanie a podobné veľkosti dávok.

1.6.4. **Hematológia a klinická biochémia**

Ak sa štúdia neurotoxicity uskutočňuje v kombinácii so štúdiou systémovej toxicity pri opakovanej dávke, vykonajú sa hematologické a klinicko-biochemické vyšetrenia, ako je uvedené v príslušnej metóde štúdie systémovej toxicity. Vzorky sa získajú tak, aby sa minimalizovali akékoľvek prípadné účinky na neurologické správanie.

1.6.5. **Histopatológia**

Neuropatologické vyšetrenie sa zameria na doplnenie a rozšírenie pozorovaní uskutočnených počas *in vivo* fázy štúdie. Tkanivá od aspoň 5 zvierat/pohlavie/skupinu (pozri tabuľku 1 a ďalší odsek) sa fixujú *in situ* s použitím všeobecne uznaných perfúznych a fixačných techník (pozri odkaz 3, kapitola 5 a odkaz 4, kapitola 50). Všetky viditeľné makroskopické zmeny sa zaznamenávajú. Keď sa štúdia uskutoční ako samostatná štúdia na zistenie neurotoxicity alebo na charakterizáciu neurotoxických účinkov, zvyšné zvieratá sa môžu použiť buď na špecifické neurobehaviorálne (10), (11), neuropatologické (10), (11), (12), (13), neurochemické (10), (11), (14), (15) alebo elektrofyziologické (10), (11), (16), (17) vyšetrenia, ktoré môžu doplniť postupy a vyšetrenia uvedené v tomto materiáli, alebo na zvýšenie počtu histopatologicky vyšetrených jedincov. Tieto dodatočné postupy môžu byť osobitne užitočné, keď empirické pozorovania alebo očakávané účinky indikujú špecifický typ alebo cieľové tkanivo v prípade neurotoxicity (2), (3). Podobe sa zvyšné zvieratá môžu použiť aj na bežné patologické hodnotenia, ako je uvedené v metóde pre štúdie pri opakovaných dávkach.

Všetky vzorky tkanív zaliate v parafíne sa zafarbia zvyčajnou metódou, ako je hematoxylín a eozín (H&E), a mikroskopicky vyšetria. Ak sa zistia alebo predpokladajú príznaky periferálnej neuropatie, vyšetria sa vzorky periferálnych nervov zaliate v umelej hmote. Klinické príznaky môžu tiež poukázať na ďalšie miesta, ktoré je potrebné vyšetriť, alebo na použitie špeciálneho postupu farbenia. Usmernenie o ďalších miestach, ktoré je potrebné vyšetriť, je možné nájsť v odkazoch (3), (4). Vhodné špeciálne farbivá na dôkaz špecifických typov patologických zmien môžu byť tiež užitočné (18).

▼B

Reprezentatívne rezy tkanív centrálneho a periferálneho nervového systému sa histologicky vyšetria (pozri odkaz 3, kapitola 5, a odkaz 4, kapitola 50). Zvyčajne sa vyšetria tieto oblasti: predný mozog, stred veľkého mozgu vrátane rezu cez hipokampus, stredný mozog, malý mozog, most, predĺžená miecha, oko s očným nervom a sietnica, zväčšenie miechy na krčných a bedrových častiach, chrbtové koreňové uzliny, tkanivá chrbtové a dutiny, proximálny sedací nerv, proximálny tibiálny nerv (na kolene) a tibiálne vetvy nervu lýtkového svalu. Rezy tkanív miechy a periferálnych nervov budú obsahovať ako krížové, tak aj priečne a pozdĺžne rezy. Je potrebné venovať pozornosť cievnatosti nervového systému. Vzorka kostrového svalu, predovšetkým lýtkového svalu sa tiež vyšetrí. Osobitnú pozornosť je potrebné venovať oblastiam s bunkovou a vláknitou štruktúrou a vzorke v CNS a PNS, o ktorých je známe, že sú osobitne náchylné na neurotoxikanty.

Poznámky o neuropatologických zmenách, ktoré sú typické na základe expozície toxickej látky, je možné nájsť v odkazoch (3), (4). Odporúča sa postupné vyšetrenie vzoriek tkanív, pri ktorých sa rezy zo skupiny s vysokou dávkou najskôr porovnajú s rezmi z kontrolnej skupiny. Ak sa nezistia žiadne neuropatologické zmeny vo vzorkách z týchto skupín, nie je potrebná ďalšia analýza. Ak sa neuropatologické zmeny zistia v skupine s vysokou dávkou, vzorka z každého potenciálne zasiahnutého tkaniva zo skupín so strednými a nízkymi dávkami sa potom zakóduje a následne vyšetrí.

Ak sa zistí akýkoľvek dôkaz neuropatologických zmien pri kvalitatívnom vyšetrení, vykoná sa druhé vyšetrenie všetkých oblastí nervového systému, kde sa tieto zmeny vyskytnú. Rezy zo všetkých dávkových skupín zo všetkých potenciálne zasiahnutých oblastí sa zakódujú a náhodne vyšetria bez informácií o kóde. Zaznamená sa frekvencia a závažnosť každého poškodenia. Po posúdení všetkých oblastí zo všetkých dávkových skupín sa môže kódovanie zrušiť a môže sa vykonať štatistická analýza na vyhodnotenie vzťahov medzi dávkou a reakciou. Je potrebné opísať príklady rôznych stupňov závažnosti každého poškodenia.

Neuropatologické zistenia by sa mali vyhodnocovať v súvislosti s pozorovaniami a meraniami správania, ako aj s inými údajmi z predchádzajúcich a súčasných štúdií systémovej toxicity testovanej látky.

2. ÚDAJE

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Je potrebné uviesť jednotlivé údaje. Okrem toho by sa všetky údaje mali zhrnúť v podobe tabuliek, kde sa uvedie pre každú pokusnú a kontrolnú skupinu počet zvierat na začiatku testu, počet zvierat, ktoré sa našli uhynuté počas testu, alebo sa usmrtili z humánnych dôvodov, čas každého uhynutia alebo humánneho usmrtenia, popis príznakov zistenej toxicity, vrátane času nástupu, trvania, typu a závažnosti toxických účinkov, počet zvierat vykazujúcich poškodenia, vrátane typu a závažnosti poškodení.

▼B

2.2. HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Zistenia zo štúdie sa vyhodnocujú na základe výskytu, závažnosti a vzájomného vzťahu medzi neurobehaviorálnymi a neuropatologickými účinkami (aj neurochemické alebo elektrofyziologické účinky, ak sa vykonali aj ďalšie vyšetrenia) a všetky ostatné zistené nepriaznivé účinky. Ak je to možné číselné výsledky sa vyhodnotia vhodnou a všeobecne akceptovateľnou štatistickou metódou. Štatistické metódy by sa mali vybrať počas prípravnej fázy štúdie.

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

— fyzikálny charakter (vrátane izomerizácie, čistoty a fyzikálno-chemických vlastností),

— identifikačné údaje.

Nosič (v prípade potreby):

— zdôvodnenie výberu nosiča.

Pokusné zvieratá:

— použitý druh/kmeň,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj, podmienky umiestnenia, aklimatizácia, krmivo atď.,

— hmotnosti jednotlivých zvierat na začiatku testu.

Testovacie podmienky:

— údaje o príprave testovanej látky/krmiva, dosiahnutých koncentráciách, stabilite a homogenite prípravku,

— špecifikácia podávaných dávok, vrátane údajov o nosiči, objeme a fyzikálnej forme podávaného materiálu,

— údaje o podávaní testovanej látky,

— zdôvodnenie výberu veľkosti dávok,

— zdôvodnenie cesty podávania a trvania expozície,

— prepočet koncentrácie testovanej látky v krmive/pitnej vode (ppm) na skutočnú dávku (mg/kg telesnej hmotnosti/deň), ak je potrebné,

— údaje o kvalite krmiva a vody.

Pozorovania a postupy testovania:

— údaje o zaradení zvierat v jednotlivých skupinách do podskupín na perfúzne fixovanie,

— údaje o systémoch hodnotenia, vrátane kritérií a stupníc hodnotenia pre každé meranie v podrobných klinických vyšetreniach,

▼B

— údaje o funkčných testoch na senzorickú reaktivitu na rôznorodé podnety (napr. sluchové, vizuálne a proprioceptívne podnety); na hodnotenie sily uchopenia končatín a na hodnotenie motorickej aktivity (vrátane údajov o automatických prístrojoch na zistenie aktivity) a iné použité postupy,

— údaje o oftalmologických vyšetreniach a v prípade potreby hematologických vyšetreniach a klinicko-biochemických testoch s príslušnými základnými hodnotami,

— údaje pre špecifické neurobehaviorálne, neuropatologické, neurochemické alebo elektrofyziologické postupy.

Výsledky:

— telesná hmotnosť/zmeny telesnej hmotnosti, vrátane telesnej hmotnosti v čase usmrtenia,

— spotreba potravy a vody, podľa potreby,

— údaje o toxickej reakcii podľa pohlavia a dávky, vrátane príznakov toxicity alebo mortality,

— charakter, závažnosť a trvanie (čas nástupu a následný priebeh) podrobných klinických vyšetrení (s údajmi o reverzibilite),

— podrobný popis všetkých výsledkov funkčných testov,

— nálezy z autopsie,

— podrobný popis všetkých neurobehaviorálnych, neuropatologických a neurochemických alebo elektrofyziologických nálezov, ak sú k dispozícii,

— údaje o absorpcii a metabolizme, ak sú k dispozícii,

— štatistické spracovanie výsledkov v prípade potreby.

Diskusia k výsledkom:

— informácie o reakcii na dávku,

— vzťah medzi inými toxickými účinkami pre výsledné posúdenie neurotoxického potenciálu testovanej chemikálie,

— hladina bez pozorovaného nepriaznivého účinku.

Závery:

— potrebné je konkrétne stanovisko k celkovej neurotoxicite testovanej chemikálie.

4. **ODKAZY**

(1) OECD Giudance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris, In Preparation.

(2) Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparation.

(3) World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.

(4) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore/London.

▼B

(5) Tupper, D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp., 40, 999 – 1003.

(6) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol. Environ. Health, 9, 691 – 704.

(7) Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. Toxic. Appl. Pharmacol., 108, 267 – 283.

(8) Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol., 1, 233 – 236.

(9) Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. Neurotoxicol. Teratol., 13, 599 – 609.

(10) Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.

(11) Chang, L.W., ed. (1995). Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.

(12) Broxup, B. (1991). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. J. Amer. Coll. Toxicol., 10, 689 – 695.

(13) Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. Fund. Appl.Toxicol., 18, 343 – 352.

(14) O'Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. Eurotoxicol. Teratol., 10, 445 – 452.

(15) O'Callaghan J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. J. Pharmacol. Exp. Ther., 244, 368 – 378.

(16) Fox. D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, pp 299 – 335.

(17) Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co.,. Baltimore, London, pp. 726 – 742.

(18) Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Pratice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

▼B

Tabuľka 1

Minimálny počet zvierat potrebných na skupinu, keď sa štúdia neurotoxicity uskutočňuje samostatne alebo v kombinácii s inými štúdiami

	ŠTÚDIA NEUROTOXICITY SA USKUTOČŇUJE AKO:			
	Samostatná štúdia	Kombinovaná štúdia s 28-dennou štúdiou	Kombinovaná štúdia s 90-dennou štúdiou	Kombinovaná štúdia so štúdiou chronickej toxicity
Celkový počet zvierat na skupinu	10 samcov a 10 samíc	10 samcov a 10 samíc	15 samcov a 15 samíc	25 samcov a 25 samíc
Počet zvierat vybratých na funkčné testovanie, vrátane podrobných klinických vyšetrení	10 samcov a 10 samíc	10 samcov a 10 samíc	10 samcov a 10 samíc	10 samcov a 10 samíc
Počet zvierat vybratých na perfúznu fixáciu *in situ* a neurohistopatológiu	5 samcov a 5 samíc	5 samcov a 5 samíc	5 samcov a 5 samíc	5 samcov a 5 samíc
Počet zvierat vybratých na vyšetrenia toxicity pri opakovanej dávke/subchronickej/chronickej toxicity, hematológiu, klinickú biochémiu, histopatológiu atď., ako sa uvádza v príslušných usmerneniach (*Guidelines*)		5 samcov a 5 samíc	10 samcov † a 10 samíc †	20 samcov † a 20 samíc †
Doplňujúce vyšetrenia, podľa potreby	5 samcov a 5 samíc			

† Vrátane piatich zvierat vybratých na funkčné testovanie a podrobné klinické vyšetrenia ako súčasť štúdie neurotoxicity.

▼B

Tabuľka 2

Frekvencia klinických vyšetrení a funkčné testy

Typ vyšetrení		Trvanie štúdie			
		Akútna	28-denná	90-denná	Chronická
U všetkých zvierat	Všeobecný zdravotný stav	denne	denne	denne	denne
	Mortalita/morbidita	dvakrát denne	dvakrát denne	dvakrát denne	dvakrát denne
U zvierat vybratých na funkčné vyšetrenia	Podrobné klinické vyšetrenia	— pred prvou expozíciou — počas 8 hodín po podaní dávky v čase očakávaného maximálneho účinku — v deň 7 a 14 po podaní dávky	— pred prvou expozíciou — potom jedenkrát týždne	— pred prvou expozíciou — počas prvého alebo druhého týždňa expozície — potom mesačne	— pred prvou expozíciou — jedenkrát na konci prvého mesiaca expozície — potom každé tri mesiace
	Funkčné testy	— pred prvou expozíciou — počas 8 hodín po podaní dávky v čase očakávaného maximálneho účinku — v deň 7 a 14 po podaní dávky	— pred prvou expozíciou — počas štvrtého týždňa ošetrenia čo možno najbližšie ku koncu obdobia expozície	— pred prvou expozíciou — jedenkrát počas prvého alebo druhého týždňa expozície — potom mesačne	— pred prvou expozíciou — jedenkrát na konci prvého mesiaca expozície — potom každé tri mesiace

▼B

B.44. **ABSORPCIA KOŽOU: METÓDA *IN VIVO***

1. **METÓDA**

Táto testovacia metóda je ekvivalentná OECD TG 427 (2004).

1.1. ÚVOD

Mnohé chemické látky pôsobia predovšetkým cez kožu, zatiaľ čo vo väčšine toxikologických štúdií na laboratórnych zvieratách sa používa perorálny spôsob podania. Štúdia perkutánnej absorpcie *in vivo* stanovená týmto usmernením poskytuje prepojenie potrebné pre extrapoláciu perorálnych štúdií, keď sa vykonáva posudzovanie bezpečnosti po dermálnej expozícii.

Kým sa látka môže dostať do krvného obehu, musí preniknúť cez veľký počet bunkových vrstiev. Vrstva určujúca rýchlosť je pre väčšinu látok *stratum corneum* pozostávajúca z mŕtvych buniek. Priepustnosť cez kožu závisí tak od lipofility chemickej látky, ako aj od hrúbky vonkajšej vrstvy epidermy a od faktorov, ako sú napríklad molekulová hmotnosť a koncentrácia látky. Vo všeobecnosti je koža potkanov a králikov priepustnejšia ako koža človeka, kým priepustnosť kože morčiat a opíc sa väčšmi podobá priepustnosti ľudskej kože.

Metódy merania perkutánnej absorpcie možno rozdeliť do dvoch kategórií; *in vivo* a *in vitro.* Metóda *in vivo* dokáže poskytnúť dobré informácie o absorpcii kožou pri rôznych druhoch laboratórnych zvierat. Nedávno sa vyvinuli metódy *in vitro.* Tieto metódy využívajú transport cez celú alebo čiastočnú hrúbku kože zvieraťa alebo človeka do zásobníka tekutiny. Metóda *in vitro* je opísaná v samostatnej testovacej metóde (1). Na pomoc pri výbere najvhodnejšej metódy v danej situácii sa odporúča preštudovať *OECD Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies* (2), pretože uvádza sa tam viac podrobností o vhodnosti metód *in vivo,* ako aj *in vitro.*

Pri metóde *in vivo,* ktorá sa tu opisuje, je možné určiť prienik testovanej látky cez kožu do krvného obehu. Táto technika sa široko používa mnoho rokov (3), (4), (5), (6), (7). Hoci štúdie perkutánnej absorpcie *in vitro* môžu byť v mnohých prípadoch vhodné, môžu sa vyskytnúť situácie, keď potrebné údaje môže poskytnúť iba štúdia *in vivo.*

Výhody metódy *in vivo* sú, že používa fyziologicky a metabolicky nedotknutý systém, používa živočíšne druhy spoločné mnohým štúdiám toxicity a možno ju modifikovať na použitie s inými živočíšnymi druhmi. Nevýhodami sú používanie živých zvierat, potreba rádioaktívne označeného materiálu na dosiahnutie spoľahlivých výsledkov, ťažkosti pri stanovovaní počiatočnej fázy absorpcie a rozdiely v priepustnosti kože uprednostňovaných druhov (potkan) a ľudskej kože. Zvieracia koža je vo všeobecnosti priepustnejšia, a preto v prípade človeka môže dôjsť k nadhodnoteniu perkutánnej absorpcie (6), (8), (9). Leptavé/žieravé látky by sa nemali testovať na živých zvieratách.

▼B

1.2. VYMEDZENIE POJMOV

Neabsorbovaná dávka: predstavuje dávku zmytú z povrchu kože po expozícii a akékoľvek množstvo prítomné na neokluzívnom krycom materiáli, vrátane akejkoľvek dávky, ktorá sa preukázateľne odparila z kože počas expozície.

Absorbovaná dávka*(in vivo):* dávka prítomná v moči, vo zvyškoch v klietke, výkaloch, vydychovanom vzduchu (ak sa meria), krvi, tkanivách (ak sa odoberajú) a v zostávajúcich častiach mŕtveho tela po odstránení kože z miesta aplikácie.

Absorbovateľná dávka: je dávka, ktorá je prítomná na koži alebo v koži po omytí.

1.3. PODSTATA TESTOVACEJ METÓDY

Testovaná látka, prednostne rádioaktívne označená, sa nanesie na ostrihanú kožu zvierat v jednej úrovni dávky alebo vo viacerých primeraných úrovniach dávok v podobe reprezentatívnej vzorky používaného prípravku. Testovací prípravok možno ponechať v styku s kožou na vopred určený čas pod vhodným krycím materiálom (neokluzívnym, polookluzívnym alebo okluzívnym), aby sa zabránilo požitiu testovacieho prípravku. Po uplynutí času pôsobenia sa krycí materiál odstráni a koža sa vyčistí vhodným čistiacim činidlom, krycí materiál a čistiaci materiál sa uchovajú na analýzu a aplikuje sa nový krycí materiál. Zvieratá sú pred dobou expozície, počas nej a po nej umiestnené v jednotlivých metabolických klietkach a exkrementy a vydychovaný vzduch sa počas tejto doby odoberajú na analýzu. Zber vydýchaného vzduchu možno vynechať, ak sú dostatočné informácie o tom, že sa vytvára málo prchavý rádioaktívny metabolit alebo sa nevytvára. Každá štúdia bude zvyčajne obsahovať niekoľko skupín zvierat, ktoré budú exponované testovaciemu prípravku. Jedna skupina bude na konci expozičnej doby usmrtená. Ostatné skupiny budú usmrtené v naplánovaných časových intervaloch (2). Po uplynutí času odberu vzoriek sa usmrtia ostatné zvieratá, na analýzu sa odoberie ich krv, miesto aplikácie sa odoberie na analýzu a mŕtve telá sa analyzujú so zreteľom na prítomnosť nevylúčeného materiálu. Vzorky sa analyzujú vhodnými prostriedkami a vykoná sa odhad miery perkutánnej absorpcie (6), (8), (9).

1.4. OPIS METÓDY

1.4.1. **Výber živočíšnych druhov**

Najčastejšie používaným živočíšnym druhom je potkan, možno však použiť aj kmene bez srsti a druhy zvierat, ktorých absorpcia kožou sa väčšmi podobná absorpcii ľudskou kožou (3), (6), (7), (8), (9). Mali by sa používať mladé dospelé zdravé zvieratá rovnakého pohlavia (automatiky zvoleným pohlavím sú samce) kmeňov bežne využívaných v laboratóriách. Na začiatku štúdie by hmotnostné odchýlky medzi použitými zvieratami nemali prevyšovať priemernú hmotnosť o viac než ± 20 %. Vhodní sú napríklad samce potkanov s hmotnosťou 200 g – 250 g, najmä samce v hornej polovici tohto hmotnostného rozsahu.

▼B

1.4.2. **Počet zvierat a ich pohlavie**

Pre každý testovací prípravok a pre každý stanovený čas skončenia treba použiť skupinu najmenej štyroch zvierat rovnakého pohlavia. Každá skupina zvierat bude usmrtená po inom časovom intervale, napríklad na konci expozície (zvyčajne 6 alebo 24 hodín) a pri následných príležitostiach (napr. 48 a 72 hodín). Ak sú dostupné údaje, ktoré predstavujú podstatné rozdiely v dermálnej toxicite medzi samcami a samicami, malo by sa vybrať pohlavie, ktoré je citlivejšie. Ak takéto údaje nie sú dostupné, možno použiť hociktoré pohlavie.

1.4.3. **Podmienky umiestnenia a kŕmenia**

Teplota experimentálnej miestnosti, kde sú zvieratá umiestnené, by mala byť 22 °C (± 3 °C). Hoci relatívna vlhkosť by mala byť najmenej 30 % a prednostne by nemala presiahnuť 70 %, okrem času čistenia miestnosti, cieľom by mala byť 50 – 60 % vlhkosť. Osvetlenie by malo byť umelé so striedaním 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie možno použiť konvenčnú laboratórnu potravu, ktorá by mala byť voľne dostupná spolu s neobmedzenou dodávkou pitnej vody. Počas vykonávania štúdie a prednostne takisto počas aklimatizácie sa zvieratá umiestnia jednotlivo do metabolických klietok. Keďže rozsypaná potrava a rozliata voda by mohli ohroziť kvalitu výsledkov, mala by sa minimalizovať pravdepodobnosť takýchto udalostí.

1.4.4. **Príprava zvierat**

Zvieratá sú označené spôsobom, ktorým sa umožňuje ich individuálna identifikácia, a umiestnia sa do klietok minimálne päť dní pred začiatkom štúdie, aby sa umožnila ich aklimatizácia na laboratórne podmienky.

Po uplynutí aklimatizačného obdobia a približne 24 hodín pred aplikáciou dávok sa na každom zvierati ostrihá z kože srsť v oblasti pliec a chrbta. Vlastnosti priepustnosti poškodenej a nepoškodenej kože sa líšia a treba dbať na to, aby sa zabránilo odieraniu kože. Po odstránení srsti a približne 24 hodín pred aplikovaním testovanej látky na kožu (pozri oddiel 1.4.7) treba povrch kože utrieť acetónom, aby sa odstránil kožný maz. Ďalšie umytie mydlom a vodou sa neodporúča, pretože akýkoľvek zvyšok mydla by mohol podporiť absorpciu testovanej látky. Plocha aplikácie musí byť dostatočne veľká, aby bolo možné spoľahlivo vypočítať absorbované množstvo testovanej chemickej látky na cm^2 kože, prednostne najmenej na 10 cm^2. Takáto plocha je prakticky možná v prípade potkanov s telesnou hmotnosťou 200 – 250 g. Po príprave sú zvieratá vrátené do metabolických klietok.

1.4.5. **Testovaná látka**

Testovaná látka je entita, ktorej penetračné vlastnosti sa majú zisťovať. V ideálnom prípade by testovaná látka mala byť rádioaktívne označená.

1.4.6. **Testovací prípravok**

Príprava testovanej látky (napr. čistý, zriedený alebo podľa receptu pripravený materiál obsahujúci testovanú chemickú látku, ktorá sa aplikuje na kožu) by mala byť rovnaká (alebo by mala byť realistickou náhradkou) ako v prípade látky, ktorej môžu byť exponovaní ľudia alebo iné potenciálne cieľové živočíšne druhy. Akékoľvek odchýlky od „používaného“ prípravku, sa musia zdôvodniť. Ak je to potrebné, testovaná látka sa rozpustí alebo suspenduje vo vhodnom prenášači. V prípade prenášačov odlišných od vody by mali byť známe absorpčné charakteristiky a potenciálna interakcia s testovanou látkou.

▼B

1.4.7. **Aplikácia na kožu**

Na povrchu kože sa vymedzí miesto aplikácie so špecifickou veľkosťou povrchu. Potom sa na toto miesto rovnomerne aplikuje známe množstvo testovacieho prípravku. Toto množstvo by zvyčajne malo imitovať množstvo, ktorému je potenciálne exponovaný človek, zvyčajne 1 – 5 mg/cm^2 pre tuhú látku alebo do 10 µl/cm^2 pre tekutiny. Akékoľvek iné množstvá by sa mali zdôvodniť predpokladanými podmienkami používania, cieľmi štúdie alebo fyzikálnymi vlastnosťami testovacieho prípravku. Po aplikácii musí byť takto ošetrené miesto chránené pred zotretím. Príklad typického zariadenia je uvedený na obrázku 1. Miesto aplikácie sa zvyčajne chráni neokluzívnym krycím materiálom (napr. krycí materiál z priepustnej nylonovej gázy). Pri neurčitých aplikáciách však treba miesto aplikácie uzavrieť. V prípade, že vyparovaním stredne prchavých testovaných látok sa miera výťažnosti testovanej látky znižuje na neprijateľnú úroveň (pozri tiež oddiel 1.4.10 prvý odsek), vyparenú látku je potrebné zachytiť vo filtri z aktívneho uhlia pokrývajúcim aplikačné zariadenie (pozri obrázok 1). Dôležité je, aby aplikačné zariadenie nepoškodzovalo kožu a aby neabsorbovalo testovací prípravok a nereagovalo s ním. Zvieratá sú vrátené do jednotlivých metabolických klietok na zber exkrementov.

1.4.8. **Trvanie expozície a odber vzoriek**

Trvanie expozície predstavuje časový interval medzi aplikáciou a odstránením testovacieho prípravku omytím kože. Mala by sa používať vhodná expozičná doba (zvyčajne 6 alebo 24 hodín) na základe predpokladanej dĺžky expozície človeka. Po expozičnej dobe sa zvieratá držia v metabolických klietkach až do stanoveného skončenia štúdie. Zvieratá treba pozorovať v pravidelných intervaloch počas celého trvania štúdie, či nevykazujú príznaky toxicity/-abnormálnych reakcií. Na konci expozičnej doby by sa ošetrená koža mala prehliadnuť, či sú na nej viditeľné znaky podráždenia.

Metabolické klietky by mali počas štúdie umožňovať samostatný odber moču a fekálií. Mali by tiež umožňovať odber oxidu uhličitého ^{14}C a prchavých zlúčenín uhlíka ^{14}C, ktoré by sa mali analyzovať, ak sa vytvárajú vo veľkom množstve (> 5 %). Moč, fekálie a zachytené tekutiny (napr. oxid uhlíka ^{14}C a prchavé zlúčeniny ^{14}C) by sa mali jednotlivo zberať pri každej skupine v každom čase odberu vzoriek. Ak existuje dostatok informácií o tom, že sa vytvára iba málo prchavý rádioaktívny metabolit alebo sa nevytvára, môžu sa použiť otvorené klietky.

Exkrementy sa zbierajú počas doby pôsobenia do 24 hodín od prvého styku s kožou a potom denne do konca experimentu. Hoci zvyčajne budú stačiť tri intervaly zberu exkrementov, predpokladaný účel testovacieho prípravku alebo existujúce kinetické údaje môžu naznačiť vhodnejšie alebo ďalšie časy pre štúdiu.

Na konci expozičnej doby sa ochranné zariadenie odstráni z každého zvieraťa a odloží sa oddelene na vykonanie analýzy. Exponovaná koža všetkých zvierat by sa mala omyť najmenej trikrát čistiacim činidlom s použitím vhodných tampónov. Musí sa postupovať opatrne, aby nedošlo ku kontaminácii ostatných častí tela. Čistiacim činidlom by mal byť prostriedok používaný na bežnú hygienu, napr. vodný roztok mydla. Nakoniec by sa koža mala vysušiť. Všetky tampóny a činidlá použité na omývanie, sa musia odložiť na analýzu. Zvieratám v skupinách, ktoré budú zachované na neskoršie pozorovanie, treba pred ich vrátením do jednotlivých klietok aplikovať čerstvý kryt na ochranu exponovaného miesta.

▼B

1.4.9. **Záverečné postupy**

Jednotlivé zvieratá z každej skupiny by sa mali usmrtiť v plánovanom čase a mala by sa odobrať krv na analýzu. Ochranné zariadenie alebo krycí materiál treba odobrať na analýzu. Z každého zvieraťa by sa na osobitnú analýzu mala odobrať koža z miesta aplikácie a vzorka neošetrenej kože z podobnej oblasti zbavenej srsti. Miesto aplikácie možno rozdeliť oddelením *stratum corneum* od spodnej epidermy, aby sa získalo viac údajov o distribúcii testovanej látky. Stanovenie časovej závislosti tejto distribúcie po expozičnej dobe by malo poskytnúť niektoré údaje o osude testovanej chemickej látky v *stratum corneum.* Na uľahčenie rozdelenia kože (po konečnom omytí kože a usmrtení zvieraťa) sa odstránia všetky ochranné kryty. Z potkana s vyreže koža v mieste aplikácie vrátane kruhového okraja kože a prišpendlí sa na dosku. Na povrch kože sa pomocou jemného tlaku pritlačí prúžok lepiacej pásky a táto páska sa potom odstráni spolu s časťou *stratum corneum.* Postupne sa aplikujú ďalšie prúžky pásky, až kým sa už páska nelepí na povrch kože a celá vrstva *stratum corneum* je odstránená Pre každé zviera možno všetky prúžky pásky vložiť spolu do jedného zásobníka, do ktorého sa pridá činidlo na rozpad tkanív, ktorým sa rozpustí *stratum corneum.* Všetky potenciálne cieľové tkanivá možno odobrať na samostatné meranie skôr, ako sa analyzujú telesné zvyšky so zreteľom na dávku absorbovanú mŕtvym telom. Mŕtve telá jednotlivých zvierat by sa mali odložiť na analýzu. Zvyčajne stačí analýza celkového obsahu. Cieľové orgány sa môžu odobrať na samostatnú analýzu (ak to indikujú iné štúdie). Moč, ktorý sa nachádza v močovom mechúre v čase usmrtenia, by sa mal pridať k moču odobratému predtým. Po zbere exkrementov z metabolických klietok v plánovanom čase usmrtenia by sa klietky a ich príslušenstvo mali umyť vhodným rozpúšťadlom. Podobne by sa malo analyzovať ostatné potenciálne kontaminované vybavenie.

1.4.10. **Analýza**

Vo všetkých štúdiách treba dosiahnuť adekvátnu výťažnosť (t. j. stredné hodnoty 100 ± 10 % rádioaktivity). Výťažnosť mimo tohto rozsahu sa musí zdôvodniť. Množstvo podanej dávky v každej vzorke by sa malo analyzovať pomocou vhodne validovaných postupov.

Štatistické hodnotenie by malo obsahovať mieru rozptylu opakovaných meraní pre každú aplikáciu.

2. **ÚDAJE**

Na každom zvierati, v každom stanovenom čase odberu vzorky by sa pre testovanú chemickú látku a/alebo metabolity mali vykonať nasledujúce merania. Okrem jednotlivých údajov by sa mali hlásiť stredné hodnoty údajov zoskupených podľa časov odberu vzoriek.

— množstvo spojené s ochrannými prostriedkami,

— množstvo, ktoré možno uvoľniť z kože,

— množstvo v/na koži, ktoré nemožno zmyť z kože,

▼B

— množstvo obsiahnuté v odobratej vzorke krvi,

— množstvo obsiahnuté v exkrementoch a vo vydychovanom vzduchu (ak je to relevantné),

— množstvo, ktoré zostalo v mŕtvom tele a vo všetkých orgánoch odobratých na samostatnú analýzu.

Množstvo testovanej látky a/alebo metabolitov v exkrementoch, vydychovanom vzduchu, krvi a v mŕtvom tele umožní stanoviť celkové množstvo absorbované v každom čase odberu vzoriek. Možno urobiť aj výpočet množstva testovanej látky absorbovanej jedným cm^2 kože exponovanej testovanej látke počas expozičnej doby.

3. **SPRÁVY**

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí zahŕňať požiadavky stanovené v protokole vrátane zdôvodnenia použitého testovacieho systému a mala by obsahovať tieto údaje:

Testovaná látka:

— identifikačné údaje [napr. číslo CAS, ak je k dispozícii; zdroj; čistota (rádiochemická čistota); známe nečistoty; číslo šarže],

— fyzikálna povaha, fyzikálno-chemické vlastnosti (napr. pH, prchavosť, rozpustnosť, stabilita, molekulová hmotnosť a log P_{ow}.

Testovací prípravok:

— zloženie a zdôvodnenie použitia,

— podrobnosti o testovacom prípravku, aplikované množstvo, dosiahnutá koncentrácia, prenášač, stabilita a homogénnosť.

Pokusné zvieratá:

— použitý živočíšny druh/kmeň,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— zdroj zvierat, podmienky umiestnenia, diéta atď.,

— hmotnosť jednotlivých zvierat na začiatku testu.

Podmienky na vykonanie testu:

— podrobnosti o podaní testovacieho prípravku (miesto aplikácie, analytické metódy, okluzívne/neokluzívne, objem, extrakcia, detekcia,

— podrobnosti o kvalite potravy a vody.

Výsledky:

— všetky príznaky toxicity,

— údaje o absorpcii v tabuľkovej forme (vyjadrené ako rýchlosť, množstvo alebo percentuálny podiel),

▼B

— celková výťažnosť experimentu,

— interpretácia výsledkov, porovnanie so všetkými dostupnými údajmi o perkutánnej absorpcii testovacej zlúčeniny.

Rozbor výsledkov

Závery

4. **ODKAZY NA LITERATÚRU**

(1) Testing Method B.45. Skin Absorption: *In vitro* Method.

(2) OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

(3) ECETOC (1993) Percutaneous Absorption. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals, Monograph No. 20.

(4) Zendzian RP (1989) Skin Penetration Method suggested for Environmental Protection Agency Requirements. *J. Am. Coll. Toxicol.* 8(5), 829 – 835.

(5) Kemppainen BW, Reifenrath WG (1990) Methods for skin absorption. CRC Press Boca Raton, FL, USA

(6) EPA (1992) Dermal Exposure Assessment: Principles and Applications. Exposure Assessment Group, Office of Health and Environmental Assessment.

(7) EPA (1998) Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870-7600, Dermal Penetration. Office of Prevention, Pedsticides and Toxic Substances.

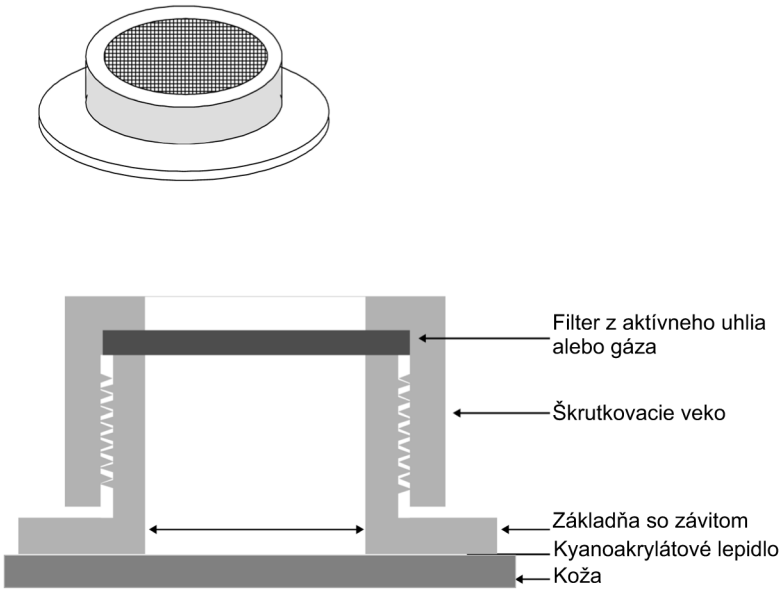
(8) Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in reshus monkeys and humans. *Fd. Chem. Toxic.* 28, 369 – 373.

(9) Feldman RJ and Maibach HI (1970) Absorption of some organic compounds through the skin in man. *J. Invest Dermatol.* 54, 399 – 404.

▼B

Obrázok 1

Príklad konštrukčného riešenia typického zariadenia používaného na vymedzenie a ochranu miesta dermálnej aplikácie počas štúdií perkutánnej absorpcie *in vivo*



▼B

B.45. **ABSORPCIA KOŽOU: METÓDA *IN VITRO***

1. **METÓDA**

Táto testovacia metóda je ekvivalentná OECD TG 428 (2004).

1.1. ÚVOD

Táto metóda je určená na poskytnutie informácií o absorpcii testovanej chemickej látky aplikovanej na vyrezanú kožu. Možno ju kombinovať buď s metódou pre absorpciu kože: metóda *in vivo* (1), alebo sa môže použiť samostatne. Odporúča sa prečítať si Usmerňovaci dokument OECD (OECD Guidance Document) pre vykonávanie štúdií kožnej absorpcie (2), ktorý slúži ako pomôcka pri príprave štúdií založených na tejto metóde. Usmerňovaci dokument bol pripravený s cieľom uľahčiť výber vhodných postupov *in vitro* na použitie v konkrétnych podmienkach, aby sa zaistila spoľahlivosť výsledkov získaných pomocou tejto metódy.

Metódy určené na meranie kožnej absorpcie a prestupu látky kožou je možné rozdeliť do dvoch kategórií: *in vivo a in vitro.* Metódy merania kožnej absorpcie *in vivo* sú dobre zavedené a poskytujú farmakokinetické informácie v rozsahu živočíšnych druhov. Metóda *in* vivo je samostatne opísaná v inej testovacej metóde (1). Metódy *in vitro* sa taktiež používajú mnoho rokov na meranie kožnej absorpcie. Hoci sa formálne validačné štúdie metód *in vitro,* ktoré sú zahrnuté v tejto testovacej metóde, dosiaľ nevykonali, odborníci OECD sa v r. 1999 zhodli, že bolo vyhodnotených dostatočné množstvo údajov na podporu metódy *in vitro* (3). V Usmerňovacom dokumente OECD (2) sú uvedené ďalšie podrobné informácie na podporu metód *in vitro,* vrátane veľkého počtu priamych porovnaní metód *in vitro a in vivo.* Existuje veľa monografií zaoberajúcich s touto problematikou, ktoré poskytujú podrobné základné informácie o používaní metódy *in vitro* (4), (5), (6), (7), (8), (9), (10), (11), (12). Pri metódach *in vitro* sa meria difúzia chemických látok do kože a ich prienik cez kožu do rezervoáru s tekutinou a môže sa použiť aj neživá koža iba na meranie difúzie, alebo čerstvá metabolicky aktívna koža na súbežné meranie difúzie metabolizmu kože. Tieto metódy našli svoje konkrétne využitie najmä pri porovnávaní prestupu chemických látok do kože a cez kožu z rozličných prípravkov, pričom môžu takisto slúžiť ako užitočné modely na posúdenie perkutánnej absorpcie u človeka.

Táto metóda *in vitro* sa nemôže použiť vo všetkých situáciách a pri všetkých triedach chemických látok. Na úvodné kvalitatívne hodnotenie prieniku látky kožou je možné použiť testovaciu metódu *in vitro.* V niektorých prípadoch môže byť potrebné pokračovať ďalej s údajmi získanými pomocou metódy *in vivo.* Na ďalšie posúdenie situácií, pre ktoré môže byť vhodná metóda *in vitro,* by sa malo postupovať podľa usmerňovacieho dokumentu (2). Ďalšie podrobné informácie na podporu rozhodnutia sú uvedené v (3).

Táto metóda uvádza všeobecné zásady na meranie dermálnej absorpcie a doplňovania testovanej látky s použitím vyrezanej kože. Možno použiť kožu z mnohých cicavcov vrátane človeka. Priepustnosť kože sa zachováva aj po vyrezaní z tela, pretože hlavnou difúznou bariérou je neživá rohovitá vrstva kože *(stratum corneum);* aktívny prenos chemikálií cez kožu sa dosiaľ nedokázal. Ukázalo sa, že koža má schopnosť metabolizovať niektoré chemikálie počas perkutánnej absorpcie (6), ale tento proces nie je limitujúci v zmysle skutočne absorbovanej dávky, aj keď môže mať vplyv na povahu materiálu prechádzajúceho do krvného obehu.

▼B

1.2. VYMEDZENIE POJMOV

Neabsorbovaná dávka: predstavuje dávku, ktorá sa zmyla z povrchu kože po expozícii, a každú prítomnú na neokluzívnom pokrytí vrátane každej dávky, ktorá sa odparila z kože počas expozície.

Absorbovaná dávka *(in vitro):* hmota testovanej látky, ktorá sa počas určeného času dostala do receptorovej kvapaliny alebo do krvného obehu.

Absorbovateľná dávka *(in vitro):* predstavuje dávku prítomnú na koži alebo v koži po omytí.

1.3. PODSTATA TESTOVACEJ METÓDY

Testovaná látka, ktorá môže byť rádioaktívne označená, sa nanesie na povrch vzorky kože oddeľujúcej dve komôrky difúznej bunky. Prv ako sa daná chemická látka odstráni vhodným čistiacim postupom, zostáva na koži počas stanoveného času a za určených podmienok. Počas experimentu sa v stanovených časových bodoch odoberajú vzorky receptorovej kvapaliny a analyzujú z hľadiska prítomnosti testovanej chemickej látky a/alebo metabolitov.

Ak sa používajú metabolicky aktívne systémy, pomocou príslušných metód je možné analyzovať metabolity testovaných chemických látok. Na konci experimentu sa prípadne môže vypočítať distribúcia testovanej chemickej látky a jej metabolitov.

Vo vhodných podmienkach, ktoré sú opísané v tejto metodike a usmerňovacom dokumente (2), sa meria absorpcia testovanej látky počas stanoveného obdobia pomocou analýzy tekutiny v receptorovej kvapaline a ošetrenej kože. Testovaná látka, ktorá zostala v koži, by sa mala pokladať za absorbovanú, ak nemožno preukázať, že absorpciu možno stanoviť na základe hodnôt nameraných v receptorovej kvapaline. Analýza ďalších komponentov (materiál zmytý s kože a zostávajúci vo vrstvách kože) umožňuje vyhodnotenie ďalších údajov, vrátane celkovej distribúcie testovanej látky a percentuálneho podielu výťažnosti testovanej látky.

Na preukázanie funkčnosti a spoľahlivosti testovacieho systému v realizačnom laboratóriu by mali byť dostupné výsledky príslušných referenčných chemických látok a tieto výsledky by mali byť v súlade s uverejnenou literatúrou pre použitú metódu. Túto požiadavku možno splniť testovaním vhodnej referenčnej látky (podľa možnosti s lipofíliou podobnou ako má testovaná látka) súčasne s testovanou látkou alebo poskytnutím adekvátnych údajov z minulosti o mnohých referenčných látkach s rôznou lipofíliou (napr. kofeín, kyselina benzoová a testosterón).

1.4. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.4.1. **Difuzér**

Difuzér pozostáva z donorovej komory a receptorovej komory, medzi ktoré sa vkladá koža (príklad typického riešenia difuzéra je zobrazený na obr. 1). Difuzér by mal poskytovať dobré utesnenie okolo kože, umožňovať ľahké odoberanie vzoriek, dobré miešanie receptorového roztoku, ktorý je v kontakte so spodnou stranou kože, a dobrú reguláciu teploty difuzéra a jeho obsahu. Prijateľné sú jednak statické a jednak prietokové difuzéry. Donorové komory sa zvyčajne ponechávajú počas expozície neuzavreté do konečnej dávky testovacieho prípravku. Pri nekonečných aplikáciách a pri niektorých scenároch konečných dávok je však možné donorové komory uzavrieť.

▼B

1.4.2. **Receptorová kvapalina**

Uprednostňuje sa použitie fyziologicky vodivej receptorovej kvapaliny, hoci sa môžu použiť aj iné, ak sa to zdôvodní. Treba uviesť presné zloženie receptorovej kvapaliny. Mala by sa preukázať adekvátna rozpustnosť testovanej chemickej látky v receptorovej kvapaline, aby nepôsobila ako prekážka pre absorpciu. Okrem toho by receptorová kvapalina nemala mať vplyv na integritu kožného preparátu. Rýchlosť prietoku v prietokovom systéme nesmie brániť difúzii testovanej látky do receptorovej kvapaliny. V systéme statického difuzéra by sa kvapalina mala neustále miešať a mali by sa z nej pravidelne odoberať vzorky. Ak sa skúma metabolizmus, receptorová kvapalina musí podporovať životaschopnosť kože počas celého experimentu.

1.4.3. **Kožné preparáty**

Na prípravu kožného preparátu možno použiť kožu človeka alebo iných živočíchov. Je známe, že použitie ľudskej kože je predmetom vnútroštátnych a medzinárodných etických úvah a podmienok. Hoci sa uprednostňuje použitie živej kože, možno použiť neživú kožu za predpokladu, že je možné preukázať integritu kože. Prijateľné sú ako epidermálne membrány (oddelené enzymaticky, teplom alebo chemicky), tak aj koža rozdelená po hrúbke (zvyčajne v hrúbke 200 – 400 μm), získaná pomocou dermatómu. Možno použiť kožu v celej hrúbke, ale malo by sa zabrániť použitiu kože s nadmernou hrúbkou *(cca.* 1 mm), ak sa to osobitne nevyžaduje na stanovenie testovanej chemickej látky v jednotlivých vrstvách kože. Výber živočíšnych druhov, anatomického miesta a preparačnej techniky sa musí zdôvodniť. Vyžadujú sa prijateľné údaje z minimálne štyroch opakovaných vzoriek na jeden testovací preparát.

1.4.4. **Integrita kožného preparátu**

Je dôležité, aby koža bola vhodne pripravená. Nevhodná manipulácia môže viesť k poškodeniu rohovitej vrstvy kože *(stratum corneum)*, a preto sa musí skontrolovať integrita kožného preparátu. Pri skúmaní metabolizmu kože by sa mala použiť čerstvo vyrezaná koža čo najskôr a za podmienok, o ktorých sa vie, že podporujú metabolickú aktivitu. Všeobecne povedané, čerstvo vyrezaná koža by sa mala použiť v priebehu 24 hodín, ale prijateľná dĺžka času skladovania sa môže líšiť v závislosti od enzymatického systému podieľajúceho sa na metabolizme a od teploty skladovania (13). Ak sa pred použitím kožné preparáty skladujú, je potrebné dokázať, že bariérová funkcia sa zachovala.

1.4.5. **Testovaná látka**

Testovaná látka je látka, ktorej penetračné vlastnosti sa skúmajú. V ideálnom prípade je testovaná látka rádioaktívne označená.

1.4.6. **Testovaný prípravok**

Prípravok testovanej látky (napríklad čistý, zriedený alebo vytvorený materiál obsahujúci testovanú látku, ktorá sa aplikuje na kožu) by mal byť rovnaký (prípadne realisticky zástupný) ako prípravok, ktorému môže byť exponovaný človek alebo iný potenciálny živočíšny druh. Každú odchýlku od „používaného“ prípravku je potrebné zdôvodniť.

▼B

1.4.7. **Koncentrácie a zloženie testovaných látok**

Zvyčajne sa používa viac ako jedna koncentrácia testovanej látky obsahujúcej horný rozsah potenciálnych expozícií ľudí. Podobe by sa malo zvážiť testovanie rozsahu typických zložení.

1.4.8. **Aplikácia na kožu**

Pri bežných podmienkach expozície ľudí chemickým látkam sa obyčajne stretávame s konečnými dávkami. Z tohto dôvodu sa pri teste musí použiť aplikácia, ktorá napodobňuje expozíciu človeka, zvyčajne 1 – 5 mg/cm^2 pri tuhých látkach a maximálne 10 µl/cm^2 pri kvapalinách. Množstvo treba zdôvodniť očakávanými podmienkami použitia, cieľmi štúdie či fyzikálnymi charakteristikami testovacieho prípravku. Napríklad aplikácia na povrch kože môže byť nekonečná, ak sa aplikujú veľké množstvá na jednotku plochy.

1.4.9. **Teplota**

Teplota ovplyvňuje pasívnu difúziu chemikálií (a tým aj ich absorpciu kožou). Difúzna komora a koža by sa mali udržiavať pri konštantnej teplote blízko normálnej teploty kože 32 °C ± 1 °C. Pre rôzne vzhľadové riešenia difuzérov sa vyžadujú rôzne vodné kúpele či teploty nahrievacích blokov na zaistenie toho, že receptor/koža je vo svoje fyziologickej norme. Odporúčaná vlhkosť by mala byť v rozsahu medzi 30 a 70 %.

1.4.10. **Dĺžka trvania expozície a odber vzoriek**

Expozícia kože testovaciemu prípravku môže trvať počas celého experimentu alebo kratšie (t. j. na napodobnenie špecifického typu expozície človeka). Nadbytočné množstvo testovacieho prípravku sa musí z kože zmyť pomocou vhodného čistiaceho prostriedku a opláchnutá tekutina sa pozbiera na analýzu. Postup odstránenia testovacieho prípravku z kože bude závisieť od očakávaných podmienok použitia a treba ho zdôvodniť. Zvyčajne sa vyžaduje odber vzoriek každých 24 hodín, aby sa umožnila adekvátna charakterizácia absorpčného profilu. Keďže integrita kože sa môže začať po 24 hodinách narušovať, čas odberu vzoriek by zvyčajne nemal presiahnuť 24 hodín. Pri testovaných látkach, ktoré rýchlo prenikajú kožou, to nemusí byť potrebné, ale dlhší časový úsek odberu vzoriek môže byť potrebný v prípade látok, ktoré prenikajú kožou pomaly. Frekvencia odberu vzoriek receptorovej kvapaliny by mala umožniť grafické vyjadrenie absorpčného profilu testovanej látky.

1.4.11. **Záverečné postupy**

Všetky zložky testovacieho systému sa musia analyzovať, pričom je potrebné stanoviť výťažnosť. To zahŕňa donorovú komoru, oplachovanie povrchu kože, kožný preparát a receptorovú kvapalinu/komoru. V niektorých prípadoch možno kožu rozdeliť na exponovanú oblasť kože a na oblasť kože pod prírubou difuzéra a na *stratum corneum,* epidermu a dermu na účely osobitnej analýzy.

1.4.12. **Analýza**

Vo všetkých štúdiách je potrebné dosiahnuť adekvátnu výťažnosť (cieľom by malo byť priemerne 100 – 10 % rádioaktivity, pričom všetky odchýlky je potrebné zdôvodniť). Pomocou vhodnej techniky sa analyzuje množstvo testovanej látky v receptorovej kvapaline, kožnom preparáte, tekutine, s ktorou sa opláchla koža, a všetky použité pomôcky.

▼B

2. **ÚDAJE**

Je potrebné zaznamenať analýzu receptorovej kvapaliny, distribúcie testovanej chemickej látky v testovacom systéme a absorpčného profilu látky v čase. Pri použití podmienok konečnej dávky expozície by sa malo vypočítať množstvo látky opláchnutej z kože, množstvo asociované s kožou (a v jednotlivých vrstvách kože, ak sa analyzujú) a množstvo prítomné v receptorovej kvapaline (prietok a množstvo či percentuálny podiel aplikovanej dávky). Absorpcia kožou môže byť niekedy vyjadrená pomocou samotných údajov týkajúcich sa receptorovej kvapaliny. Ak však testovaná látka ostáva na konci štúdie v koži, možno ju bude potrebné zahrnúť do celkového absorbovaného množstva (pozri odsek 66 v odkaze na literatúru 3). Keď sa použijú podmienky konečnej dávky expozície, na základe údajov bude možné vypočítať konštantu priepustnosti (Kp). V tomto prípade nie je dôležitý percentuálny podiel absorbovanej látky.

3. **SPRÁVY**

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí zahŕňať požiadavky stanovené v protokole vrátane zdôvodnenia použitého testovacieho systému a musí obsahovať tieto údaje:

Testovaná látka:

— fyzikálna povaha, fyzikálno-chemické vlastnosti (aspoň molekulová hmotnosť a pod. a log P_{ow}), čistota (rádiochemická čistota),

— identifikačné údaje (napr. číslo šarže),

— rozpustnosť v receptorovej kvapaline.

Testovací prípravok:

— zloženie a zdôvodnenie použitia,

— homogenita.

Testovacie podmienky:

— zdroje a anatomické miesto odberu kože, spôsob prípravy, podmienky skladovania pred použitím, predchádzajúca expozícia (čistiace látky, antibiotické ošetrenia a pod.), meranie integrity kože, metabolický stav, zdôvodnenie použitia,

— konštrukčné riešenie difuzéra, zloženie receptorovej kvapaliny, rýchlosť prietoku receptorovej kvapaliny či intervaly a postupy odberu vzoriek,

— podrobnosti o aplikácii testovacieho prípravku a kvantifikácia aplikovanej dávky,

— dĺžka expozície,

— podrobnosti o odstraňovaní testovacieho prípravku z kože, napr. oplachovanie kože,

— podrobnosti o analýze kože a všetkých frakčných technikách použitých na preukázanie distribúcie látky v koži,

▼B

— postupy umývania difuzéra a zariadenia,

— testovacie metódy, extrakčné techniky, limity detekcie a validácia analytickej metódy.

Výsledky

— celková výťažnosť experimentu (aplikovaná dávka = opláchnutie z kože + koža + receptorová kvapalina + opláchnutia difuzéra),

— zaznamenanie jednotlivých hodnôt výťažnosti z každého oddelenia difuzéra do tabuľky,

— absorpčný profil,

— zaznamenanie údajov o absorpcii do tabuľky (vyjadrené ako rýchlosť, množstvo či percentuálny podiel).

Rozbor výsledkov

Záver

4. **ODKAZY NA LITERATÚRU**

(1) Testing Method B.44. Skin Absorption: *In vivo* Method.

(2) OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.

(3) OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.

(4) Kemppainen BW and Reifenrath WG. (1990). Methods for skin absorption. CRC Press, Boca Raton.

(5) Bronaugh RL and Collier, SW. (1991). Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Studies, in *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications,* RL Bronaugh and HI Maibach, Eds., CRC Press, Boca Raton, pp. 237 – 241.

(6) Bronaugh RL and Maibach HI. (1991). *In vitro Percutaneous Absorption: Principles, Fundamentals and Applications.* CRC Press, Boca Raton.

(7) European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (1993). Monograph No. 20, Percutaneous Absorption, ECETOC, Brussels.

(8) Diembeck W, Beck H, Benech-Kieffer F, Courtellemont P, Dupuis J, Lovell W, Paye M, Spengler J, Steiling W (1999). Test Guidelines for *In Vitro* Assessment of Dermal Absorption and Percutaneous Penetration of Cosmetic Ingredients, Fd Chem Tox, 37, 191 – 205.

(9) Recommended Protocol for *In vitro* Percutaneous Absorption Rate Studies (1996). US Federal Register, Vol. 61, No. 65.

(10) Howes D, Guy R, Hadgraft J, Heylings JR *et al.* (1996). Methods for assessing Percutaneous absorption. ECVAM Workshop Report ATLA 24, 81 R10.

▼B

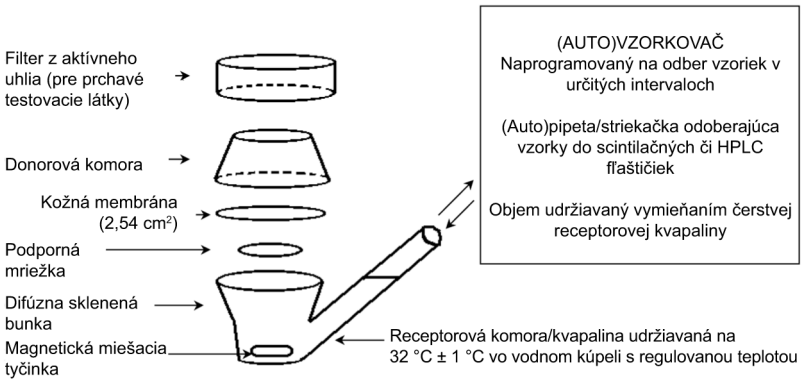
(11) Schaefer H and Redelmeier TE. (1996). Skin barrier: principles of percutaneous absorption. Karger, Basel.

(12) Roberts MS and Walters KA. (1998). Dermal absorption and toxicity assessment. Marcel Dekker, New York.

(13) Jewell, C., Heylings, JR., Clowes, HM. And Williams, FM. (2000). Percutaneous absorption and metabolism of dinitrochlorobenzene in vitro. Arch Toxicol 74: 356 – 365.

Obrázok 1

Príklad typického riešenia statického difuzéra používaného pri štúdiách perkutánnej absorpcie *in vitro*



▼M3

B.46. PODRÁŽDENIE KOŽE *IN VITRO*: TEST NA MODELI REKONŠTRUOVANEJ ĽUDSKEJ POKOŽKY

ÚVOD

1. Podráždením kože sa rozumie reverzibilné poškodenie kože po aplikácii testovanej chemikálie maximálne na štyri hodiny [v znení definície podľa globálneho harmonizovaného systému klasifikácie a označovania chemických látok (GHS) Organizácie Spojených národov (OSN) a nariadenia Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí (1) (3)]. Touto testovacou metódou (TM) sa zabezpečuje postup *in vitro*, ktorý možno použiť na identifikáciu nebezpečnosti dráždivých chemikálií (látok a zmesí) v súlade s kategóriou 2 GHS OSN a CLP EÚ (1) (2) (3). V EÚ a v ďalších regiónoch, ktoré neprijali nepovinnú kategóriu 3 GHS OSN (látky spôsobujúce mierne podráždenie), túto testovaciu metódu možno použiť aj na identifikáciu chemikálií, ktoré nie sú klasifikované, t. j. sú „bez kategórie“ v zmysle GHS OSN a CLP EÚ (1) (3). Táto testovacia metóda sa môže použiť na určenie podráždenia pokožky chemikáliami ako nezávislý test, ktorý slúži ako náhrada za testy podráždenia kože *in vivo* v rámci stratégie testovania na viacerých úrovniach (4 a kapitola B.4 tejto prílohy).

2. Posudzovanie podráždenia kože sa zvyčajne vykonáva na laboratórnych zvieratách [usmernenie OECD na vykonávanie testov 404; kapitola B.4 tejto prílohy] (4). Pokiaľ ide o obavy o dobré životné podmienky zvierat, metóda B.4 bola v roku 2004 zrevidovaná a umožňuje určiť poleptanie/podráždenie kože pomocou stratégie testovania na viacerých úrovniach s použitím validovaných testovacích metód *in vitro* alebo *ex vivo*, vďaka čomu sa vylúči bolesť a utrpenie zvierat. Tri validované testovacie metódy *in vitro* boli prijaté ako usmernenia OECD na vykonávanie testov 430, 431 a 435 (5) (6) (7) a dve z nich ako kapitoly B.40 a B.40a tejto prílohy a budú sa používať pri tej časti stratégie testovania na viacerých úrovniach metódy B.4 alebo usmernenia OECD na vykonávanie testov 404, ktorá sa týka poleptania (4).

3. Táto testovacia metóda sa týka koncového bodu podráždenia kože pre ľudské zdravie. Je založená na modeloch rekonštruovanej ľudskej pokožky, ktoré svojím celkovým usporiadaním (použitie netransformovaných keratinocytov získaných z ľudskej pokožky ako zdroja buniek a použitie reprezentatívneho tkaniva a cytoarchitektúry) dôkladne napodobňujú biochemické a fyziologické vlastnosti vrchnej časti ľudskej kože, t. j. epidermy. Táto testovacia metóda tiež zahŕňa súbor noriem výkonnosti (PS) (dodatok 2) na posudzovanie podobných a upravených testovacích metód založených na modeli rekonštruovanej ľudskej pokožky (RhE) Európskym centrom pre potvrdzovanie alternatívnych metód ES (ECVAM) (8) v súlade so zásadami usmerňujúceho dokumentu OECD č. 34 (9).

4. Požiadavkám tejto testovacej metódy vyhovujú tri validované metódy. Ukončili sa štúdie týkajúce sa postupov pred validáciou, optimalizácie a validácie pre metódu *in vitro* (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20), ktorá používa model rekonštruovanej ľudskej pokožky a je komerčne dostupná ako EpiSkin™ (označuje sa ako validovaná referenčná metóda – VRM). Ďalšie dve komerčne dostupné metódy na podráždenie kože *in vitro*, a to metódy EpiDerm™ SIT (EPI-200) a SkinEthic™ RHE (22), používajú modely rekonštruovanej ľudskej pokožky a vykázali podobné výsledky ako validovaná referenčná metóda podľa validácie založenej na normách výkonnosti (22).

▼M3

5. Skôr ako sa na účely regulácie použije navrhovaná podobná alebo upravená metóda *in vitro* založená na modeli RhE, ktorá je iná ako validovaná referenčná metóda alebo metódy založené na modeli RhE EpiDerm™ SIT (EPI-200) alebo SkinEthic™, mala by sa stanoviť jej spoľahlivosť, relevantnosť (presnosť) a obmedzenia jej navrhovaného používania, aby sa zabezpečila jej porovnateľnosť s validovanou referenčnou metódou v súlade s požiadavkami noriem výkonnosti stanovenými v tejto testovacej metóde (dodatok 2). Okrem toho pred vytvorením alebo validovaním podobnej alebo upravenej metódy *in vitro* založenej na modeli RhE a jej predložením na prijatie regulačným orgánom (23) sa odporúča konzultovať dokument OECD, ktorý vysvetľuje základné informácie o testovaní podráždenia kože *in vitro*.

VYMEDZENIE POJMOV

6. Použité definície sú uvedené v dodatku 1.

ÚVODNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

7. Ako preukazuje validačná štúdia (16), obmedzením testovacej metódy je, že neumožňuje klasifikáciu chemikálií do nepovinnej kategórie 3 (látky spôsobujúce mierne podráždenie) v zmysle GHS OSN (1). Keď sa táto metóda používa ako čiastočný náhradný test, možno bude potrebné vykonať následný test *in vivo*, aby sa dal úplne charakterizovať potenciál podráždenia kože (4 a kapitola B.4 tejto prílohy). Uznáva sa, že použitie ľudskej pokožky podlieha vnútroštátnym a medzinárodným etickým zásadám a podmienkam.

8. Táto testovacia metóda sa týka zložky podráždenia kože *in vitro* v rámci stratégie testovania na viacerých úrovniach metódy B.4 (usmernenie OECD o vykonávaní testov 404) týkajúcej sa podráždenia/poleptania kože (4). Keďže táto testovacia metóda neposkytuje dostatok informácií o poleptaní kože, treba poznamenať, že kapitola B.40a (usmernenie OECD o vykonávaní testov 431) o poleptaní kože je založená na tom istom systéme testovania na modeli RhE, no používa iný protokol (kapitola B.40a). Táto metóda je založená na modeloch rekonštruovanej ľudskej pokožky a používa ľudské keratinocyty, a preto predstavuje *in vitro* cieľový orgán druhov, ktoré sú predmetom záujmu. Okrem toho sa priamo vzťahuje na počiatočný krok zápalovej kaskády/zápalového akčného mechanizmu (poškodenie buniek a tkanív vedúce k lokálnej traume), ku ktorým dochádza počas podráždenia *in vivo*. V rámci validácie, ktoré je základom tejto testovacej metódy, bol otestovaný celý rad chemikálií a empirická databáza validačnej štúdie obsahuje celkovo 58 chemikálií (16) (18) (23). To platí pre tuhé látky, kvapaliny, polotuhé látky a vosky. Kvapaliny môžu byť vodné alebo nevodné, tuhé látky môžu byť rozpustné alebo nerozpustné vo vode. Ak je to možné, tuhé látky sa pred aplikáciou rozdrvia na jemný prášok; iná predpríprava vzorky nie je potrebná. Plyny a aerosóly ešte neboli posúdené vo validačnej štúdii (24). Aj keď je možné, že tieto látky sa môžu testovať technológiou RhE, súčasná testovacia metóda neumožňuje testovanie plynov a aerosólov. Treba tiež poznamenať, že silno sfarbené chemikálie môžu narúšať merania životaschopnosti bunky a vyžadujú si použitie prispôsobených kontrol na korekcie (pozri odseky 24 – 26).

9. Jeden pokus, ktorý sa skladá z troch replík tkaniva, by mal byť postačujúci na testovanie chemikálie, ak je jej klasifikácia jednoznačná. V prípadoch s hraničnými výsledkami, napríklad ak sa nezhodujú merania replík a/alebo ak sa percentuálny priemer životaschopnosti rovná 50 ± 5 %, treba zvážiť vykonanie druhého pokusu, ako aj tretieho pokusu, ak sa výsledky z prvých dvoch pokusov nezhodujú.

▼M3

PRINCÍP TESTU

10. Testovaná chemikália sa lokálne aplikuje na trojrozmerný model RhE pozostávajúci z netransformovaných keratinocytov získaných z ľudskej pokožky, ktoré sa vykultivovali tak, aby vytvorili viacvrstvový, vysoko diferencovaný model ľudskej pokožky. Pozostáva z organizovanej bazálnej vrstvy, vrstvy ostnitých buniek a vrstvy zrnitých buniek a viacvrstvovej rohovitej vrstvy (*stratum corneum*) obsahujúcej medzibunkové lipidové lamelové vrstvy predstavujúce hlavné triedy lipidov, ktoré sú analogické vrstvám nachádzajúcim sa *in vivo*.

11. Podráždenie kože vyvolané chemikáliou, ktoré sa prejavuje erytémom a edémom, je výsledkom kaskády udalostí, ktoré sa začínajú prienikom do *stratum corneum* a poškodením hlbšie ležiacich vrstiev keratinocytov. Hynúce keratinocyty uvoľňujú mediátory, ktoré začnú zápalovú kaskádu pôsobiacu na bunky kože, najmä na stromálne a endotelové bunky. Dilatácia a zvýšená permeabilita endotelových buniek spôsobuje príznaky erytému a edému (24). Metódy založené na RhE merajú počiatočné udalosti v kaskáde.

12. Životaschopnosť buniek v modeloch RhE sa meria enzymatickou premenou vitálneho farbiva MTT [3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazólium-bromid, tiazolylová modrá, číslo CAS 298-93-1)] na modrú formazánovú soľ, ktorá sa kvantitatívne meria po extrakcii z tkanív (25). Dráždivé chemikálie sa identifikujú na základe ich schopnosti spôsobiť pokles životaschopnosti buniek pod vymedzenú prahovú úroveň (t. j. ≤ 50 % pre kategóriu 2 GHS OSN/EÚ CLP). V závislosti od regulačného rámca, v ktorom sa výsledky tejto testovacej metódy používajú, chemikálie, ktoré spôsobujú zvýšenie životaschopnosti buniek nad vymedzenú prahovú úroveň, možno považovať za nedráždivé látky (t. j. > 50 %, bez kategórie).

PREUKÁZANIE SPÔSOBILOSTI

13. Predtým, ako sa začne bežne používať ktorákoľvek z troch validovaných metód, ktorá vyhovuje požiadavkám tejto testovacej metódy, laboratóriá by mali preukázať technickú spôsobilosť pomocou desiatich referenčných chemikálií uvedených v tabuľke 1. Pri podobných metódach vyvinutých v rámci tejto testovacej metódy alebo pri úpravách ktorejkoľvek z troch validovaných metód by sa mali splniť požiadavky noriem výkonnosti opísané v dodatku 2 k tejto testovacej metóde predtým, ako sa začnú používať na regulačné testovanie.

14. Ako súčasť postupu overovania spôsobilosti sa odporúča, aby používateľ overil bariérové vlastnosti tkanív po ich prijatí, ako to stanovuje tvorca modelu RhE. To je dôležité najmä vtedy, ak sa tkanivá zasielajú na veľkú vzdialenosť alebo počas dlhého časového obdobia. Po úspešnom stanovení metódy a preukázaní spôsobilosti na jej použitie už takéto overovanie nebude bežne potrebné. Pri pravidelnom používaní metódy sa však odporúča naďalej posudzovať bariérové vlastnosti v pravidelných intervaloch.

Tabuľka 1

Referenčné chemikálie ([1])

Chemikália	Číslo CAS	Hodnota *in vivo* ([2])	Fyzikálny stav	Kategória GHS OSN/EÚ CLP
Kyselina naftalénoctová	86-87-3	0	tuhá látka	bez kategórie
Izopropanol	67-63-0	0,3	kvapalina	bez kategórie

▼M3

Chemikália	Číslo CAS	Hodnota *in vivo* (2)	Fyzikálny stav	Kategória GHS OSN/EÚ CLP
Metyl-stearát	112-61-8	1	tuhá látka	bez kategórie
Heptyl-butyrát	5870-93-9	1,7	kvapalina	bez kategórie (*nepovinná kat. 3*) (3) (4)
Hexyl-salicylát	6259-76-3	2	kvapalina	bez kategórie (*nepovinná kat. 3*) (3) (4)
3-p-kumenyl-2-metylpropanál	103-95-7	2,3	kvapalina	kat. 2
1-brómhexán	111-25-1	2,7	kvapalina	kat. 2
Hydroxid draselný (5 % roztok)	1310-58-3	3	kvapalina	kat. 2
1-metyl-3-fenyl-1-piperazín	5271-27-2	3,3	tuhá látka	kat. 2
Heptanál	111-71-7	3,4	kvapalina	kat. 2

(1) Tieto referenčné chemikálie patria do podskupiny referenčných chemikálií použitých vo validačnej štúdii.
(2) Hodnotenie *in vivo* v súlade s kapitolou B.4 a usmernením OECD na vykonávanie testov 404 (4).
(3) V rámci tejto testovacej metódy sa nepovinná kategória 3 (látky spôsobujúce mierne podráždenie) v zmysle GHS OSN (1) považuje za kategóriu „bez kategórie“.
(4) Nepovinná kategória 3 v zmysle GHS OSN sa v rámci EÚ CLP neuplatňuje.

POSTUP

15. Nasleduje opis zložiek a postupov metódy RhE na posúdenie podráždenia kože. Model RhE by sa mal zrekonštruovať a možno ho pripraviť interne alebo získať komerčne. K dispozícii sú štandardné pracovné postupy (SOP) pre EpiSkin™, EpiDerm™ SIT (EPI-200) a SkinEthic™ RHE (26) (27) (28). Testovanie by sa malo vykonať takto:

Zložky testovacej metódy RhE

Všeobecné podmienky

16. Na rekonštrukciu epitelu by sa mali použiť netransformované ľudské keratinocyty. Pod funkčnou vrstvou *stratum corneum* by sa malo nachádzať viac vrstiev životaschopných epitelových buniek (bazálna vrstva, *stratum spinosum*, *stratum granulosum*). *Stratum corneum* by mala byť viacvrstvová a obsahovať potrebný profil lipidov, aby sa vytvorila silná funkčná bariéra, ktorá odolá rýchlemu prenikaniu cytotoxických markerových chemikálií, ku ktorým patrí napr. dodecylsulfát sodný (SDS) alebo Triton X-100. Bariérovú funkciu treba preukázať a môže sa posudzovať buď stanovením koncentrácie, pri ktorej markerová chemikália znižuje životaschopnosť tkanív o 50 % (IC_{50}) po pevne stanovenom expozičnom čase, alebo stanovením expozičného času, ktorý je potrebný na zníženie životaschopnosti buniek o 50 % (ET_{50}) po aplikácii markerovej chemikálie v určitej pevne stanovenej koncentrácii. Izolačné vlastnosti modelu RhE by mali zabrániť prieniku materiálu okolo *stratum corneum* do životaschopného tkaniva, čo by viedlo k chybnému modelovaniu expozície kože. Model RhE by nemal byť kontaminovaný baktériami, vírusmi, mykoplazmami ani hubami.

▼M3

Funkčné podmienky

Životaschopnosť

17. Skúška použitá na stanovenie stupňa životaschopnosti je skúška MTT (25). Používatelia modelu RhE by sa mali ubezpečiť, že každá šarža modelu RhE spĺňa kritériá stanovené pre negatívnu kontrolu (NC). Optická hustota (OD) samotného extrakčného rozpúšťadla by mala byť dostatočne malá, t. j. OD < 0,1. Rozsah prijateľnosti (horná a dolná hranica) pre hodnoty optickej hustoty pri negatívnej kontrole (v podmienkach testovacej metódy na podráždenie kože) stanovuje tvorca/dodávateľ modelu RhE a rozsahy prijateľnosti pre 3 validované metódy sú uvedené v tabuľke 2. Malo by sa zaznamenať, že tkanivá ošetrené negatívnou kontrolou sú počas expozičného obdobia testu stabilné v kultúre (zabezpečujú podobné výsledky merania životaschopnosti).

Tabuľka 2

Rozsahy prijateľnosti hodnôt optickej hustoty pri negatívnej kontrole

	Dolná hranica prijateľnosti	Horná hranica prijateľnosti
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic™ RHE	≥ 1,2	≤ 2,5

Bariérová funkcia

18. *Stratum corneum* a zloženie jej lipidov by mali byť schopné zabrániť rýchlemu prieniku cytotoxických markerových chemikálií, ku ktorým patrí napr. SDS alebo Triton X-100, podľa odhadu pomocou IC_{50} alebo ET_{50} (tabuľka 3).

Morfológia

19. Model RhE by sa mal histologicky preskúmať, aby sa preukázalo, že má štruktúru podobnú ľudskej pokožke (vrátane viacvrstvovej *stratum corneum*).

Reprodukovateľnosť

20. Výsledky pozitívnej kontroly (PC) a negatívnych kontrol (NC) testovacej metódy by mali preukázať reprodukovateľnosť v čase.

Kontrola kvality (QC)

21. Tvorca/dodávateľ modelu RhE by mal zabezpečiť a preukázať, že každá šarža použitého modelu RhE spĺňa stanovené kritériá na uvoľnenie do obehu, v rámci ktorých sú najvýznamnejšie kritériá životaschopnosti (odsek 17), bariérovej funkcie (odsek 18) a morfológie (odsek 19). Tieto údaje by sa mali poskytnúť používateľom metódy, aby mohli túto informáciu zahrnúť do správy o teste. Rozsah prijateľnosti (horná a dolná hranica) pre IC_{50} alebo ET_{50} by mal stanoviť tvorca/dodávateľ modelu RhE (alebo výskumný pracovník v prípade použitia interného modelu). Na spoľahlivú prognózu klasifikácie podráždenia sú prijateľné len tie výsledky, ktoré sa získali z kvalifikovaných tkanív. Ako príklad sa v tabuľke 3 uvádzajú rozsahy prijateľnosti pre tri validované metódy.

▼M3

Tabuľka 3

Príklady kritérií kontroly kvality na uvoľnenie šarží do obehu

	Dolná hranica prijateľnosti	Horná hranica prijateľnosti
EpiSkin™ (SM) (18-hodinové ošetrenie SDS) (26)	IC_{50} = 1,0 mg/ml	IC_{50} = 3,0 mg/ml
EpiDerm™ SIT (EPI-200) (1 % triton X-100) (27)	ET_{50} = 4,8 hod.	ET_{50} = 8,7 hod.
SkinEthic™ RHE (1 % triton X-100) (28)	ET_{50} = 4,0 hod.	ET_{50} = 9,0 hod.

Aplikácia testovaných a kontrolných chemikálií

22. Pri každej testovanej chemikálii a kontrolách by sa mali použiť aspoň tri repliky na jeden pokus. V prípade kvapalných aj pevných látok je potrebné na celý povrch kože rovnomerne naniesť dostatočné množstvo testovacej chemikálie, pričom je nutné sa vyhýbať nekonečnej dávke, t. j. malo by sa použiť minimálne 25 µL/cm^2 alebo 25 mg/cm^2. V prípade tuhých látok by sa mal pred aplikáciou povrch pokožky zvlhčiť deionizovanou alebo destilovanou vodou, aby sa tak zlepšil kontakt testovanej chemikálie s povrchom pokožky. Ak je to možné, tuhé látky by sa mali vždy testovať vo forme jemného prášku. Na konci expozičného času by sa testovaná chemikália mala dôkladne zmyť z povrchu pokožky tlmivým roztokom alebo 0,9 % roztokom NaCl. V závislosti od toho, ktorá z troch validovaných metód RhE sa použije, expozičný čas sa môže pohybovať v rozmedzí od 15 do 60 minút a inkubačná teplota v rozmedzí od 20 °C do 37 °C. Tento expozičný čas a teploty sa optimalizujú pre každú metódu RhE a zastupujú rôzne prirodzené vlastnosti týchto metód. Ďalšie informácie sa nachádzajú v štandardných pracovných postupoch pre metódy (26) (27) (28).

23. V každom pokuse by sa mali súbežne vykonať negatívne a pozitívne kontroly, aby sa preukázalo, že životaschopnosť (negatívna kontrola), bariérová funkcia a výsledná tkanivová citlivosť tkanív (pozitívna kontrola) sú v rámci stanoveného historického rozsahu prijateľnosti. Navrhovanou chemikáliou na pozitívnu kontrolu je 5 % vodný dodecylsulfát sodný (SDS). Navrhovanými chemikáliami na negatívnu kontrolu sú voda alebo fosfátom tlmený fyziologický roztok (PBS).

Merania bunkovej životaschopnosti

24. Najdôležitejším prvkom testovacieho postupu je to, že merania životaschopnosti sa nevykonávajú ihneď po expozícii testovaným chemikáliám, ale až po dostatočne dlhom inkubačnom čase po ošetrení opláchnutých tkanív v čerstvom médiu. Tento čas umožňuje regeneráciu po slabých cytotoxických účinkoch, ako aj výskyt jasných cytotoxických účinkov. Počas fázy optimalizácie testu (11) (12) (13) (14) (15) sa ako optimálny ukázal byť 42-hodinový inkubačný čas po ošetrení.

25. Skúška MTT je validovaná kvantitatívna metóda, ktorá by sa mala používať na meranie životaschopnosti buniek v rámci tejto testovacej metódy. Je vhodná na použitie v trojrozmernom modeli tkaniva. Vzorka tkaniva sa na 3 hodiny vloží do roztoku MTT s vhodnou koncentráciou (napr. 0,3 – 1 mg/mL). Pomocou rozpúšťadla (napr. izopropanol, kyslý izopropanol) sa potom z tkaniva extrahuje vyzrážaný modrý formazánový produkt, pričom koncentrácia formazánu sa odmeria stanovením optickej hustoty pri 570 nm pomocou priepustného pásmového filtra maximálne ± 30 nm.

▼M3

26. Optické vlastnosti testovanej chemikálie alebo jej chemický účinok na MTT môžu interferovať so skúškou, čo vedie k nesprávnemu odhadu životaschopnosti (keďže testovaná chemikália môže zabraňovať procesu tvorby farby alebo ho zvrátiť, ale rovnako ho môže aj spôsobovať). K tomu môže dôjsť, keď sa špecifická testovacia chemikália úplne neodstráni z tkaniva pri oplachovaní alebo keď prenikne cez pokožku. Ak testovaná chemikália pôsobí priamo na MTT (redukcia MTT), je prirodzene zafarbená alebo sa zafarbí pri ošetrovaní tkaniva, mali by sa použiť ďalšie kontroly, aby sa zistilo, či nedochádza k interferencii testovanej chemikálie s technikou merania životaschopnosti, a aby sa táto prípadná interferencia upravila. Podrobný opis opravy priamej redukcie MTT a interferencií s farbivami sa nachádza v štandardných pracovných postupoch pre tri validované metódy (26) (27) (28).

Kritériá prijateľnosti

27. Pri každej metóde, pri ktorej sa používajú validované šarže modelu RhE (pozri odsek 21), by tkanivá ošetrené negatívnou kontrolou mali vykázať optickú hustotu, ktorá odráža kvalitu tkanív po všetkých krokoch zaslania a prijatia a po všetkých procesoch protokolu. Hodnoty optickej hustoty pri kontrole by nemali byť nižšie ako historicky stanovené hranice. Podobne by tkanivá ošetrené pozitívnou kontrolou, t. j. 5 % vodným SDS, mali odrážať ich schopnosť reagovať na dráždivú chemikáliu v podmienkach testovacej metódy (26) (27) (28). Mali by sa stanoviť súvisiace a vhodné opatrenia variability medzi replikami tkaniva [napr. ak sa použijú štandardné odchýlky (SD), mali by sa nachádzať v rámci jednostranného 95 % intervalu tolerancie, ktorý sa vypočíta z historických údajov pre SD validovanej referenčnej metódy (VRM SD) < 18 %].

Interpretácia výsledkov a model na prognózy

28. Hodnoty optickej hustoty namerané pre každú testovanú chemikáliu sa môžu použiť na výpočet percentuálneho podielu životaschopnosti normalizovanej na negatívnu kontrolu, ktorá je stanovená na 100 %. Je potrebné jasne definovať, zdokumentovať a preukázať hraničnú percentuálnu hodnotu životaschopnosti buniek, ktorá rozlišuje medzi dráždivými chemikáliami a testovanými chemikáliami, ktoré nie sú klasifikované, a štatistickým(-i) postupom(-mi) použitým(-i) pri hodnotení výsledkov a identifikácii dráždivých chemikálií. Hraničné hodnoty prognózy podráždenia sú uvedené ďalej v texte:

— Testovaná chemikália sa pokladá za dráždivú pre kožu v súlade s kategóriou 2 GHS OSN/CLP EÚ, ak životaschopnosť tkaniva po expozícii a inkubácii po ošetrení je menšia alebo sa rovná (≤) 50 %.

— V závislosti od regulačného rámca, v ktorom sa výsledky tejto testovacej metódy používajú, testovanú chemikáliu možno považovať za nedráždivú pre kožu patriacu do kategórie „bez kategórie“ podľa GHS OSN/CLP EÚ, ak životaschopnosť tkaniva po expozícii a inkubácii po ošetrení je väčšia ako (>) 50 %.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

29. Pri každom pokuse je potrebné do tabuľky zaznamenať údaje z jednotlivých replík tkanív (napr. hodnoty optickej hustoty a vypočítaný percentuálny podiel životaschopnosti buniek pre každú testovanú chemikáliu vrátane klasifikácie) vrátane údajov o opakovaných pokusoch, ak je to vhodné. Okrem toho by sa mali pre každý pokus uvádzať aj stredné hodnoty ± štandardnej odchýlky (SD). Pozorované interakcie s reagentom MTT a zafarbenými testovanými chemikáliami by sa mali oznamovať pre každú testovanú chemikáliu.

▼**M3**

Správa o teste

30. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testované a kontrolné chemikálie:

— chemický názov (chemické názvy), ako napríklad názov podľa CAS a číslo CAS, názov podľa EC a číslo EC, ak je známe,

— čistota a zloženie chemikálie (v hmotnostných percentách),

— fyzikálno-chemické vlastnosti relevantné na vykonanie štúdie (napr. fyzikálny stav, stabilita, prchavosť, hodnota pH a rozpustnosť vo vode, ak je známa),

— prípadná úprava testovaných/kontrolných chemikálií pred testovaním (napr. zahriatie, rozomletie),

— podmienky skladovania.

Zdôvodnenie použitého modelu RhE a protokolu

Podmienky testovania:

— použitý bunkový systém,

— úplné podporné údaje o použitom osobitnom modeli RhE vrátane jeho výkonnosti. K nim by mala patriť predovšetkým:

  i) životaschopnosť;

  ii) bariérová funkcia;

  iii) morfológia;

  iv) reprodukovateľnosť a predvídateľnosť;

  v) kontroly kvality modelu (QC),

— podrobné informácie o použitom postupe testovania,

— použité testovacie dávky, trvanie expozície a inkubácie po ošetrení,

— opis všetkých modifikácií testovacieho postupu,

— odkaz na historické údaje o modeli. K nim by mali patriť predovšetkým:

  i) prijateľnosť údajov o kontrole kvality s odkazom na historické údaje o šaržiach;

  ii) prijateľnosť hodnôt pozitívnych a negatívnych kontrol s odkazom na prostriedky a rozpätia pozitívnych a negatívnych kontrol,

— opis použitých hodnotiacich kritérií vrátane zdôvodnenia výberu hraničného bodu (hraničných bodov) pre model na prognózy,

— odkaz na historické kontrolné údaje.

▼**M3**

Výsledky:

— údaje z individuálnych testovaných chemikálií pre meranie každého pokusu a každej repliky,

— indikácie kontrol použitých na priamu redukciu MTT a/alebo na zafarbenie testovaných chemikálií,

— opis ďalších pozorovaných účinkov.

Rozbor výsledkov

Záver

LITERATÚRA

1. UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, UN New York and Geneva. K dispozícii na stránke: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev03/03files_e.html].

2. EC-ECVAM (2009), Statement on the „Performance under UN GHS of three *in vitro* assays for skin irritation testing and the adaptation of the Reference Chemicals and Defined Accuracy Values of the ECVAM skin irritation Performance Standards“, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC30), 9 April 2009. K dispozícii na stránke: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

3. Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006 (Ú. v. EÚ L 353, 31.12.2008, s. 1).

4. OECD (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 404, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

5. OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Transcutaneous Electrical Resistance (TER), OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 430, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

6. OECD (2004), *In Vitro* Skin Corrosion: Human Skin Model Test, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 431, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

7. OECD (2006), *In Vitro* Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 435, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

8. EC-ECVAM (2009), Performance Standards for *in vitro* skin irritation test methods based on Reconstructed human Epidermis (RhE)? K dispozícii na stránke: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

9. OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, OECD Series on Testing and Assessment No 34, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

10. Fentem, J. H., Briggs, D., Chesné, C., Elliot, G. R., Harbell, J. W., Heylings, J. R., Portes, P., Roguet, R., van de Sandt, J. J. M. and Botham, P. (2001), A prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, Results and evaluation by the Management Team, Toxicol. in Vitro 15, 57 – 93.

11. Portes, P., Grandidier, M.-H., Cohen, C. and Roguet, R. (2002), Refinement of the EPISKIN protocol for the assessment of acute skin irritation of chemicals: follow-up to the ECVAM prevalidation study, Toxicol. in Vitro 16, 765 – 770.

▼**M3**

12. Kandárová, H., Liebsch, M., Genschow, E., Gerner, I., Traue, D., Slawik, B. and Spielmann, H. (2004), Optimisation of the EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests, ALTEX 21, 107 – 114.

13. Kandárová, H., Liebsch, M., Gerner, I., Schmidt, E., Genschow, E., Traue, D. and Spielmann, H. (2005), The EpiDerm test protocol for the upcoming ECVAM validation study on *in vitro* skin irritation tests – An assessment of the performance of the optimised test, ATLA 33, 351 – 367.

14. Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Portes, P., Roguet, R. and Rubinsteen, G. (2005), The *in vitro* acute skin irritation of chemicals: optimisation of the EPISKIN prediction model within the framework of the ECVAM validation process, ATLA 33, 329 – 349.

15. Zuang, V., Balls, M., Botham, P. A., Coquette, A., Corsini, E., Curren, R. D., Elliot, G. R., Fentem, J. H., Heylings, J. R., Liebsch, M., Medina, J., Roguet, R., van De Sandt, J. J. M., Wiemann, C. and Worth, A. (2002), Follow-up to the ECVAM prevalidation study on *in vitro* tests for acute skin irritation, The European Centre for the Validation of Alternative Methods Skin Irritation Task Force report 2, ATLA 30, 109 – 129.

16. Spielmann, H., mailto: Hoffmann, S., Liebsch, M., Botham, P., Fentem, J., Eskes, C., Roguet, R., Cotovio, J., Cole, T., Worth, A., Heylings, J., Jones, P., Robles, C., Kandárová, H., mailto: Gamer, A., Remmele, M., Curren, R., Raabe, H., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: Report on the validity of the EPISKIN and EpiDerm assays and on the skin integrity function test, ATLA 35, 559 – 601.

17. Hoffmann, S. (2006), ECVAM skin irritation validation study phase II: Analysis of the primary endpoint MTT and the secondary endpoint IL1-α. K dispozícii na stránke: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

18. Eskes, C., Cole, T., Hoffmann, S., Worth, A., Cockshott, A., Gerner, I. and Zuang, V. (2007), The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for acute skin irritation: selection of test chemicals, ATLA 35, 603 – 619.

19. Cotovio, J., Grandidier, M.-H., Lelièvre, D., Roguet, R., Tinois-Tessonneaud, E. and Leclaire, J. (2007), *In vitro* acute skin irritancy of chemicals using the validated EPISKIN model in a tiered strategy – Results and performances with 184 cosmetic ingredients, AATEX, 14, 351 – 358.

20. EC-ECVAM (2007), Statement on the validity of *in vitro* tests for skin irritation, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC26), 27 April 2007. K dispozícii na stránke: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

21. EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. K dispozícii na stránke: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

22. EC-ECVAM (2008), Statement on the scientific validity of *in vitro* tests for skin irritation testing, issued by the ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC29), 5 November 2008. K dispozícii na stránke: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

23. OECD (2010), Explanatory background document to the OECD draft Test Guideline on *in vitro* skin irritation testing. OECD Series on Testing and Assessment, No 137, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [http://www.oecd.org/document/24/0,3746,en_2649_34377_47858904_1_1_1_1,00.html].

24. Welss, T., Basketter, D. A. and Schröder, K. R. (2004), *In vitro* skin irritation: fact and future. State of the art review of mechanisms and models, Toxicol. in Vitro 18, 231 – 243.

▼**M3**

25. Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, J. Immunol. Methods 65, 55 – 63.

26. EpiSkin™ SOP, Version 1.8 (February 2009), ECVAM Skin Irritation Validation Study: Validation of the EpiSkin™ test method 15 min. – 42 hours for the prediction of acute skin irritation of chemicals. K dispozícii na stránke: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

27. EpiDerm™ SOP, Version 7.0 (Revised March 2009), Protocol for:*In vitro* EpiDerm™ skin irritation test (EPI-200-SIT), For use with MatTek Corporation's reconstructed human epidermal model EpiDerm (EPI-200). K dispozícii na stránke: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

28. SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.0 (February 2009), SkinEthic skin irritation test-42bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals: 42 minutes application + 42 hours post-incubation. K dispozícii na stránke: [http://ecvam.jrc.ec.europa.eu].

29. Harvell, J. D., Lamminstausta, K., and Maibach, H. I. (1995), Irritant contact dermatitis, In: Practical Contact Dermatitis, pp 7-18, (Ed. Guin J. D.). Mc Graw-Hill, New York.

30. Smernica Komisie 2001/59/ES zo 6. augusta 2001, ktorou sa po 28-krát prispôsobuje technickému pokroku smernica Rady 67/548/EHS o aproximácii zákonov, iných právnych predpisov a správnych opatrení týkajúcich sa klasifikácie, balenia a označenia nebezpečných látok (Ú. v. ES L 225, 21.8.2001, s. 1).

31. Basketter, D. A., York, M., McFadden, J. P. and Robinson, M. K. (2004), Determination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. Contact Dermatitis 51, 1 – 4.

32. Jirova, D., Liebsch, M., Basketter, D., Spiller, E., Kejlova, K., Bendova, H., Marriott, M. and Kandarova, H. (2007), Comparison of human skin irritation and photo-irritation patch test data with cellular *in vitro* assays and animal *in vivo* data, ALTEX, 14, 359 – 365.

33. Jírová, D., Basketter, D., Liebsch, M., Bendová, H., Kejlová, K., Marriott, M. and Kandárová, H. (2010), Comparison of human skin irritation patch test data with *in vitro* skin irritation assays and animal data, Contact Dermatitis, 62, 109 – 116.

▼M3

Dodatok 1

Vymedzenie pojmov

Presnosť: Miera zhody výsledkov testovacej metódy s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o opatrenie výkonnosti testovacej metódy a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa ako synonymum pojmu „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy (9).

Životaschopnosť buniek: Parameter na meranie celkovej aktivity bunkovej populácie, ako napríklad schopnosť bunkových mitochondriálnych dehydrogenáz redukovať vitálne farbivo MTT [3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazólium bromid, tiazolylová modrá)], ktorý v závislosti od posledného meraného koncového bodu a od použitej koncepcie testu zodpovedá celkovému počtu a/alebo vitalite živých buniek.

Zhoda: Ide o mieru výkonnosti testovacej metódy pre testovacie metódy, ktoré poskytujú kategorizačné výsledky, a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa používa ako synonymum pojmu presnosť a je vymedzený ako podiel všetkých testovaných chemikálií, ktoré sú správne klasifikované ako pozitívne alebo negatívne (9).

ET_{50}: Môže sa odhadnúť stanovením expozičného času potrebného na zníženie životaschopnosti buniek o 50 % pri použití markerovej chemikálie v špecifickej pevne určenej koncentrácii (pozri takisto IC_{50}).

CLP EÚ (nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí): Zavádza v Európskej únii (EÚ) systém GHS OSN klasifikácie a označovania chemických látok (látok a zmesí) (3).

GHS [Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemických látok Organizáciou Spojených národov (OSN)]: Systém navrhovania klasifikácie chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a úrovní fyzickej, zdravotnej a environmentálnej nebezpečnosti a označovania pomocou príslušných komunikačných prvkov, ako sú piktogramy, signalizačné slová, výstražné upozornenia, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov, ktoré obsahujú informácie o ich škodlivých účinkoch z hľadiska ochrany ľudí (vrátane zamestnávateľov, pracovníkov, prepravcov, spotrebiteľov a záchranných zložiek) a životného prostredia (1).

IC_{50}: Môže sa odhadnúť stanovením koncentrácie, pri ktorej markerová chemikália znižuje životaschopnosť tkanív o 50 % (IC_{50}) po pevne stanovenom expozičnom čase (pozri takisto ET_{50}).

Nekonečná dávka: Množstvo testovanej chemikálie aplikovanej na pokožku, ktoré prekračuje množstvo potrebné na úplné a rovnomerné pokrytie povrchu pokožky.

Test me-too: Hovorový názov testovacej metódy, ktorá je štrukturálne a funkčne podobná validovanej a akceptovanej referenčnej testovacej metóde. Takáto testovacia metóda by bola kandidátom na ďalšiu validáciu. Môže sa používať namiesto podobnej testovacej metódy (9).

Normy výkonnosti (PS): Normy založené na validovanej testovacej metóde, ktoré slúžia ako základ na hodnotenie porovnateľnosti navrhovanej testovacej metódy, ktorá je mechanicky a funkčne podobná. Patria sem: i) nevyhnutné zložky testovacej metódy; ii) minimálny zoznam referenčných chemikálií vybraných spomedzi látok používaných na preukázanie prijateľnej výkonnosti validovanej testovacej metódy a iii) porovnateľné úrovne presnosti a spoľahlivosti založené na tom, čo sa získalo pre validovanú testovaciu metódu a čo by navrhovaná testovacia metóda mala preukázať pri hodnotení pomocou minimálneho zoznamu referenčných chemikálií (9).

▼**M3**

Referenčné chemikálie: Chemikálie vybrané na použitie v procese validácie, pre ktorý už sú známe odozvy v referenčnom testovacom systéme *in vitro* alebo *in vivo* alebo odozvy u daných druhov zvierat. Tieto chemikálie by mali byť zástupcami tried chemikálií, v súvislosti s ktorými sa očakáva použitie testovacej metódy, a mali by zastupovať celý rozsah odoziev od silných po slabé alebo negatívne odozvy, ktoré možno očakávať od chemikálií, pri ktorých sa môže metóda použiť. Rôzne skupiny referenčných chemikálií sa môžu vyžadovať v rôznych štádiách procesu validácie a pre rôzne testovacie metódy a použitia testov (9).

Relevantnosť: Opis vzťahu testu k účinku, ktorý je predmetom záujmu, a či je tento účinok zmysluplný a užitočný na konkrétny účel. Ide o mieru, do akej test správne meria alebo prognózuje biologický účinok, ktorý je predmetom záujmu. Relevantnosť zohľadňuje presnosť (zhodu) testovacej metódy (9).

Spoľahlivosť: Meria rozsah, v rámci ktorého sa môže testovacia metóda počas istého časového obdobia opakovane vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Posudzuje sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti (9).

Náhradný test: Test, ktorý predstavuje náhradu za test, ktorý sa bežne používa a je schválený na identifikáciu nebezpečnosti a/alebo hodnotenie rizika a o ktorom sa rozhodlo, že poskytuje rovnakú alebo zlepšenú úroveň ochrany zdravia ľudí alebo zvierat alebo životného prostredia v porovnaní so schváleným testom pre všetky možné testovacie situácie a chemikálie (9).

Citlivosť: Podiel všetkých pozitívnych/aktívnych testovaných chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky, a ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (9).

Podráždenie kože: Vytvorenie reverzibilného poškodenia kože po aplikácii testovanej chemikálie v trvaní do štyroch hodín. Podráždenie kože je lokálne vyvolaná, neimunogenetická reakcia, ktorá sa objaví krátko po stimulácii (29). Jeho charakteristickou vlastnosťou je reverzibilný proces, ku ktorému patria zápalové reakcie a väčšina klinických prejavov podráždenia charakteristických pre zápalový proces (erytém, edém, svrbenie a bolesť).

Špecifickosť: Podiel všetkých negatívnych/neaktívnych testovaných chemikálií, ktoré sa testom správne klasifikovali. Je to miera presnosti testovacej metódy, ktorá poskytuje kategorizačné výsledky, a ide o dôležité hľadisko pri hodnotení relevantnosti testovacej metódy (9).

Stratégia testovania na viacerých úrovniach: Testovanie, ktoré používa testovacie metódy na základe postupnosti; o testovacích metódach vybraných na každej po sebe nasledujúcej úrovni sa rozhoduje podľa výsledkov na predchádzajúcej úrovni testovania (9).

Testovaná chemikália (nazývaná aj testovaná látka): Akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

▼M3

Dodatok 2

Normy výkonnosti na posudzovnie navrhnutých podobných alebo upravených metód na podráždenie kože in vitro založených na modeli rekonštruovanej ľudskej pokožky (RhE)

ÚVOD

1. Cieľom noriem výkonnosti (PS) je oznámiť základ, na ktorom možno určiť, že nové testovacie metódy, chránené (t. j. chránené autorským právom, obchodnou značkou, registrované), ako aj nechránené sú dostatočne presné a spoľahlivé na konkrétne účely testovania. Tieto normy výkonnosti sú založené na validovaných a akceptovaných testovacích metódach a možno ich použiť na hodnotenie spoľahlivosti a presnosti ďalších podobných metód (hovorovo nazývaných testy „me-too“), ktoré sú založené na podobných vedeckých zásadách a merajú alebo prognózujú rovnaký biologický alebo toxický účinok (9).

2. Pred prijatím upravených metód (t. j. navrhnutých potenciálnych zlepšení schválenej metódy) je potrebné vykonať hodnotenie s cieľom stanoviť účinok navrhnutých zmien na výkonnosť testu a rozsah, v akom takéto zmeny ovplyvňujú informácie dostupné pre ďalšie zložky procesu validácie. V závislosti od počtu a povahy navrhovaných zmien, získaných údajov a sprievodnej dokumentácie k týmto zmenám by sa na ne mal vzťahovať rovnaký proces validácie, akým prechádza nový test, alebo prípadne obmedzené posúdenie spoľahlivosti a relevantnosti na základe zavedených noriem výkonnosti (9).

3. Podobné (me-too) alebo upravené metódy jednej z troch validovaných metód [EpiSkin™ (validovaná referenčná metóda – VRM), EpiDerm™ SIT (EPI-200) a SkinEthic™ RHE] navrhnuté v rámci tejto testovacej metódy by sa mali posúdiť s cieľom určiť ich spoľahlivosť a presnosť s použitím chemikálií, ktoré zastupujú celý rozsah výsledkov dráždivosti Draizovho testu. Pri hodnotení navrhovaných podobných alebo upravených metód pomocou 20 odporúčaných referenčných chemikálií noriem výkonnosti (tabuľka 1) by tieto metódy mali mať hodnoty spoľahlivosti a presnosti, ktoré sú porovnateľné alebo lepšie ako hodnoty odvodené z validovaných referenčných metód (tabuľka 2) (2) (16). Hodnoty presnosti a spoľahlivosti, ktoré by sa mali dosiahnuť, sa uvádzajú v odsekoch 8 až 12 tohto dodatku. Zaraďujú sa sem neklasifikované („bez kategórie“ podľa GHS OSN/CLP EÚ) aj klasifikované chemikálie (kategória 2 GHS OSN/CLP EÚ) (1), ktoré zastupujú rôzne chemické triedy, aby sa spoľahlivosť a presnosť (citlivosť, špecifickosť a celková presnosť) navrhovanej metódy mohli porovnať s hodnotami validovanej referenčnej metódy. Pred použitím metódy pri testovaní nových chemikálií je potrebné stanoviť jej spoľahlivosť, ako aj jej schopnosť správne identifikovať dráždivé chemikálie kategórie 2 GHS OSN/CLP EÚ a v závislosti od regulačného rámca, pre ktorý sa získavajú údaje, aj jej schopnosť správne identifikovať chemikálie „bez kategórie“ podľa GHS OSN/CLP EÚ.

4. Tieto normy výkonnosti sú založené na normách výkonnosti ES ECVAM (8), ktoré boli aktualizované podľa systémov klasifikácie a označovania GHS OSN a CLP EÚ (1) (3). Pôvodné normy výkonnosti boli vymedzené po dokončení validačnej štúdie (21) a sú založené na klasifikačnom systéme EÚ, ako ustanovuje smernica Komisie 2001/59/ES zo 6. augusta 2001, ktorou sa po 28-krát prispôsobuje technickému pokroku smernica Rady 67/548/EHS o aproximácii zákonov, iných právnych predpisov a správnych opatrení týkajúcich sa klasifikácie, balenia a označenia nebezpečných látok ([1]). V dôsledku prijatia systému GHS OSN klasifikácie a označovania v EÚ (CLP EÚ) (3), ku ktorému došlo medzi ukončením validačnej štúdie a dokončením tejto testovacej metódy, sa normy výkonnosti

([1]) Ú. v. ES L 225, 21.8.2001, s. 1.

▼M3

aktualizovali (8). Táto aktualizácia sa týka najmä zmien: i) v skupine referenčných chemikálií v rámci noriem výkonnosti a ii) vymedzených hodnôt spoľahlivosti a presnosti (2) (23).

NORMY VÝKONNOSTI TESTOVACÍCH METÓD RHE NA PODRÁŽDENIE KOŽE *IN VITRO*

5. Normy výkonnosti zahŕňajú tieto tri zložky (9):

I. Nevyhnutné zložky testovacej metódy

II. Minimálny zoznam referenčných chemikálií

III. Vymedzené hodnoty spoľahlivosti a presnosti.

I. **Nevyhnutné zložky testovacej metódy**

6. Skladajú sa z dôležitých štrukturálnych, funkčných a procedurálnych prvkov validovanej metódy, ktoré by mali byť zahrnuté do protokolu navrhovanej mechanicky a funkčne podobnej alebo upravenej metódy. Tieto zložky zahŕňajú jedinečné charakteristiky metódy, kritické procedurálne podrobnosti a opatrenia v oblasti kontroly kvality. Súlad s nevyhnutnými zložkami testovacej metódy prispeje k zabezpečeniu toho, aby podobná alebo upravená metóda bola založená na rovnakých koncepciách ako zodpovedajúca validovaná referenčná metóda (VRM) (9). Nevyhnutné zložky testovacej metódy sú podrobne opísané v odsekoch 16 až 21 testovacej metódy a testovanie by sa malo vykonať takto:

— Všeobecné podmienky (odsek 16)

— Funkčné podmienky, ktoré zahŕňajú:

— životaschopnosť (odsek 17),

— bariérovú funkciu (odsek 18),

— morfológiu (odsek 19),

— reprodukovateľnosť (odsek 20) a

— kontrolu kvality (odsek 21).

II. **Minimálny zoznam referenčných chemikálií**

7. Referenčné chemikálie sa používajú na určenie toho, či spoľahlivosť a presnosť navrhovanej podobnej alebo upravenej metódy, o ktorej sa dokázalo, že sa štrukturálne a funkčne dostatočne podobá validovanej referenčnej metóde alebo mierne upravuje jednu z troch validovaných metód, sú porovnateľné alebo lepšie ako spoľahlivosť a presnosť validovanej referenčnej metódy (2) (8) (16) (23). V tabuľke 1 je zahrnutých 20 odporúčaných referenčných chemikálií, ktoré zastupujú rôzne chemické triedy (t. j. chemické kategórie založené na funkčných skupinách), ako aj celý rozsah výsledkov dráždivosti Draizovho testu (od nedráždiacich až po silne dráždiace chemikálie). Chemikálie zahrnuté do tohto zoznamu pozostávajú z 10 chemikálií kategórie 2 podľa GHS OSN/CLP EÚ a 10 chemikálií „bez kategórie“, z ktorých 3 patria do nepovinnej kategórie 3 v zmysle GHS OSN. V rámci tejto testovacej metódy sa nepovinná kategória 3 považuje za kategóriu „bez kategórie“. Chemikálie uvedené v tabuľke 1 sú vybrané z chemikálií použitých vo fáze optimalizácie, ktorá nasledovala po fáze pred validáciou, a vo validačnej štúdii validovanej referenčnej metódy, pokiaľ ide o funkčný a fyzikálny stav chemikálie (14) (18). Tieto referenčné chemikálie zastupujú minimálny počet chemikálií, ktoré by sa mali použiť na hodnotenie presnosti a spoľahlivosti navrhovanej podobnej alebo upravenej metódy, ale nemali

▼M3

by sa používať na vývoj nových metód. V prípade, keď uvedená chemikália nie je k dispozícii, môžu sa použiť iné chemikálie, pre ktoré existujú dostatočné referenčné údaje *in vivo*, najmä chemikálie, ktoré boli použité vo fáze optimalizácie nasledujúcej po fáze pred validáciou alebo vo validačnej štúdii validovanej referenčnej metódy. Ak je to žiaduce, môžu sa do minimálneho zoznamu referenčných chemických látok doplniť ďalšie chemikálie, ktoré predstavujú ostatné chemické triedy a pre ktoré sú dostupné dostatočné referenčné údaje *in vivo*, aby sa tak mohla ďalej hodnotiť presnosť navrhovanej metódy.

Tabuľka 1

Minimálny zoznam referenčných chemických látok na stanovenie hodnôt presnosti a spoľahlivosti podobných alebo upravených metód na podráždenie kože založených na modeli rekonštruovanej ľudskej pokožky ([1])

Chemikália	Číslo CAS	Fyzikálny stav	Hodnota *in vivo*	VRM kat. *in vitro*	GHS OSN/CLP EÚ kat. *in vivo*
1-bróm-4-chlórbután	6940-78-9	kvapalina	0	kat. 2	bez kategórie
Dietylftalát	84-66-2	kvapalina	0	bez kategórie	bez kategórie
Kyselina naftalénoctová	86-87-3	tuhá látka	0	bez kategórie	bez kategórie
Alyl-fenoxyacetát	7493-74-5	kvapalina	0,3	bez kategórie	bez kategórie
Izopropanol	67-63-0	kvapalina	0,3	bez kategórie	bez kategórie
4-(metylsulfanyl)benzaldehyd	3446-89-7	kvapalina	1	kat. 2	bez kategórie
Metyl-stearát	112-61-8	tuhá látka	1	bez kategórie	bez kategórie
Heptyl-butyrát	5870-93-9	kvapalina	1,7	bez kategórie	bez kategórie
Hexyl-salicylát	6259-76-3	kvapalina	2	bez kategórie	bez kategórie
(E)-3-fenylpropenál	104-55-2	kvapalina	2	kat. 2	bez kategórie (*nepovinná kat. 3*) ([3])
1-dekanol ([2])	*112-30-1*	*kvapalina*	*2,3*	*kat. 2*	*kat. 2*
3-p-kumenyl-2-metylpropanál	103-95-7	kvapalina	2,3	kat. 2	kat. 2
1-brómhexán	111-25-1	kvapalina	2,7	kat. 2	kat. 2
2-chlórmetyl-3,5-dimetyl-4-metoxypyridín HCl	86604-75-3	tuhá látka	2,7	kat. 2	kat. 2
Dipropyldisulfán ([2])	*629-19-6*	*kvapalina*	*3*	*bez kategórie*	*kat. 2*
Hydroxid draselný (5 % roztok)	1310-58-3	kvapalina	3	kat. 2	kat. 2
Benzénetiol, 5-(1,1 dimetyletyl)-2-metyl	7340-90-1	kvapalina	3,3	kat. 2	kat. 2
1-metyl-3-fenyl-1-piperazín	5271-27-2	tuhá látka	3,3	kat. 2	kat. 2

▼M3

Chemikália	Číslo CAS	Fyzikálny stav	Hodnota *in vivo*	VRM kat. *in vitro*	GHS OSN/CLP EÚ kat. *in vivo*
Heptanál	111-71-7	kvapalina	3,4	kat. 2	kat. 2
Tetrachlóretylén	127-18-4	kvapalina	4	kat. 2	kat. 2

([1]) Výber chemikálií je založený na týchto kritériách: i) chemikálie sú komerčne dostupné; ii) zastupujú celý rad výsledkov dráždivosti Draizovho testu (od nedráždiacich až po silne dráždiace); iii) majú dobre definovanú chemickú štruktúru; iv) reprezentujú chemickú funkčnosť použitú v procese validácie a v) nesúvisia s extrémne toxickým profilom (napr. karcinogénnym alebo toxickým pre reprodukčný systém) a nesúvisia s obmedzujúcimi nákladmi na zneškodnenie.

([2]) Chemikálie, ktoré spôsobujú podráždenie u králikov, ale u ktorých je spoľahlivo dokázané, že nespôsobujú podráždenie u ľudí (31) (32) (33).

([3]) Podľa GHS OSN, nie podľa EÚ CLP.

III. **Vymedzené hodnoty spoľahlivosti a presnosti**

8. Na účely stanovenia spoľahlivosti a relevantnosti navrhovaných podobných alebo upravených metód, ktoré by sa mali prenášať medzi laboratóriami, je potrebné aspoň v troch laboratóriách otestovať všetkých 20 referenčných chemikálií, ktoré sú uvedené v tabuľke 1. Ak sa však navrhovaná metóda má používať iba v jednom laboratóriu, multilaboratórne testovanie nebude na jej validáciu potrebné. Je však nevyhnutné, aby takéto validačné štúdie nezávisle posúdili medzinárodne uznávané validačné orgány v súlade s medzinárodnými usmerneniami (9). V každom laboratóriu by sa všetkých 20 referenčných chemikálií malo testovať v troch nezávislých pokusoch vykonaných s rôznymi šaržami tkaniva v dostatočných časových odstupoch. Každý pokus by mal obsahovať minimálne tri súbežne testované repliky tkaniva pre každú zapojenú testovanú chemikáliu, negatívnu kontrolu a pozitívnu kontrolu.

9. Pri výpočte hodnôt spoľahlivosti a presnosti navrhovanej metódy by sa mali spoločne zvážiť všetky štyri kritériá uvedené nižšie, čím sa zabezpečí, že hodnoty spoľahlivosti a relevantnosti sú vypočítané vopred vymedzeným a konzistentným spôsobom:

   1. Na výpočet variability a schopnosti prognózy (presnosti) metódy v rámci laboratória a medzi laboratóriami sa použijú iba tie údaje, ktoré pochádzajú z úplnej série pokusov.

   2. Konečná klasifikácia každej referenčnej chemikálie v každom zúčastnenom laboratóriu by sa mala získať použitím strednej hodnoty životaschopnosti počas rôznych pokusov v rámci úplnej série pokusov.

   3. Na výpočet medzilaboratórnej variability metódy sa použijú iba údaje pre tie chemikálie, s ktorými boli vykonané úplné série pokusov vo všetkých zúčastnených laboratóriách.

   4. Výpočet hodnôt presnosti by mal byť založený na jednotlivých laboratórnych prognózach získaných pre 20 referenčných chemikálií v rôznych zúčastnených laboratóriách.

   V tomto kontexte sa **séria pokusov** skladá z troch nezávislých pokusov s jednou testovanou chemikáliou z jedného laboratória. **Úplná séria pokusov** je séria pokusov s jednou testovanou chemikáliou z jedného laboratória, pričom všetky tri pokusy sú platné. To znamená, že jediný neplatný pokus ruší platnosť celej série troch pokusov.

Vnútrolaboratórna reprodukovateľnosť

10. Hodnotenie vnútrolaboratórnej reprodukovateľnosti by malo dokázať súlad s klasifikáciami (kategória 2 a „bez kategórie“ v zmysle GHS OSN/CLP EÚ) získanými pri iných, nezávislých pokusoch s 20 referenčnými chemikáliami v rámci jedného laboratória, ktorý je vyšší ako alebo sa rovná (≥) 90 %.

▼M3

Medzilaboratórna reprodukovateľnosť

11. Hodnotenie medzilaboratórnej reprodukovateľnosti nie je nevyhnutné, ak sa navrhovaná metóda používa len v jednom laboratóriu. Pre metódy, ktoré sa budú prenášať medzi laboratóriami, by mal byť súlad s klasifikáciami (kategória 2/„bez kategórie“ v zmysle GHS OSN/CLP EÚ) získanými pri rôznych, nezávislých pokusoch s 20 referenčnými chemikáliami najlepšie medzi minimálne tromi laboratóriami vyšší ako alebo sa rovnať (≥) 80 %.

Schopnosť prognózy (presnosť)

12. Presnosť (citlivosť, špecifickosť a celková presnosť) navrhovanej podobnej alebo upravenej metódy by mala byť porovnateľná alebo lepšia ako presnosť validovanej referenčnej metódy, pričom sa berú do úvahy dodatočné informácie týkajúce sa relevantnosti pri druhoch, ktoré sú predmetom záujmu (tabuľka 2). Citlivosť by sa mala rovnať alebo by mala byť väčšia (≥) ako 80 % (2) (8) (23). Citlivosti navrhovanej metódy *in vitro* sa však týka ďalšie konkrétne obmedzenie vzhľadom na to, že len dve chemikálie *in vivo* kategórie 2, 1-dekanol a dipropyldisulfán, môžu byť viac ako jedným zúčastneným laboratóriom nesprávne klasifikované ako chemikálie „bez kategórie“. Špecifickosť by sa mala rovnať alebo by mala byť väčšia (≥) ako 70 % (2) (8) (23). Neexistuje ďalšie obmedzenie, pokiaľ ide o špecifickosť navrhnutej metódy *in vitro*, t. j. každé zúčastnené laboratórium môže nesprávne klasifikovať ktorúkoľvek chemikáliu *in vivo* ako chemikáliu „bez kategórie“, pokiaľ sa konečná špecifickosť testovacej metódy nachádza v prijateľnom rozsahu. Celková presnosť by sa mala rovnať alebo by mala byť väčšia (≥) ako 75 % (2) (8) (23). Aj keď citlivosť validovanej referenčnej metódy vypočítaná pre 20 referenčných chemikálií uvedených v tabuľke 1 sa rovná 90 %, vymedzená hodnota minimálnej citlivosti požadovanej pre akúkoľvek podobnú alebo upravenú metódu, ktorá sa má považovať za validovanú, je stanovená na 80 %, keďže 1-dekanol (hraničná chemikália) aj dipropyldisulfán (falošný negatívny výsledok validovanej referenčnej metódy) sú známe tým, že nespôsobujú podráždenie kože u ľudí (31) (32) (33), aj keď boli identifikované ako dráždivé v teste s králikmi. Keďže modely RhE sú založené na bunkách ľudského pôvodu, môže sa predpokladať, že tieto chemikálie nespôsobujú podráždenie („bez kategórie“ v zmysle GHS OSN/CLP EÚ).

Tabuľka 2

Požadované predpokladané hodnoty citlivosti, špecifickosti a celkovej presnosti potrebné na to, aby sa každá podobná alebo upravená metóda mohla považovať za validovanú

Citlivosť	Špecifickosť	Celková presnosť
≥ 80 %	≥ 70 %	≥ 75 %

Kritériá schválenia štúdie

13. Je možné, že jeden alebo viacero testov týkajúcich sa jednej alebo viacerých testovaných chemikálií nespĺňa kritériá na schválenie testu a kontrolných chemikálií alebo nie je prijateľný(-ých) z iných dôvodov. Na doplnenie chýbajúcich údajov pri každej testovanej chemikálii sú prijateľné maximálne dva doplňujúce testy („opakované testovanie“). Presnejšie povedané, keďže v prípade opakovaného testovania je potrebné súbežne testovať aj negatívne a pozitívne kontroly, možno vykonať maximálne dva ďalšie pokusy pre každú testovanú chemikáliu.

14. Je možné, že ani po opakovanom testovaní sa nepodarí získať minimálny počet troch platných pokusov požadovaných pre každú testovanú chemikáliu v prípade každej referenčnej chemikálie v každom zúčastnenom laboratóriu, čo bude viesť k neúplnej matici údajov. V takýchto prípadoch, aby bolo možné považovať tieto súbory údajov za prijateľné, treba splniť všetky tieto tri kritériá:

1. So všetkými 20 referenčnými chemikáliami by mala byť vykonaná aspoň jedna úplná séria pokusov.

▼**M3**

2. V každom z minimálne troch zúčastnených laboratórií musia úplné série pokusov predstavovať aspoň 85 % (pre 20 chemikálií, t. j. 3 neplatné série pokusov v jednom laboratóriu sú prijateľné).

3. Minimálne v troch laboratóriách musí zo všetkých možných sérií pokusov aspoň 90 % predstavovať úplné série pokusov (pre 20 chemikálií testovaných v troch laboratóriách; t. j. 6 neplatných sérií pokusov v jednom laboratóriu je prijateľných).

▼M2

B. 47 **TESTOVACIA METÓDA ZÁKALU A PRIEPUSTNOSTI HOVÄDZEJ ROHOVKY NA ZISŤOVANIE OČNÝCH ŽIERAVÍN A SILNE DRÁŽDIVÝCH LÁTOK**

ÚVOD

1. Testovacia metóda zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky je testovacia metóda *in vitro*, ktorá sa môže používať za určitých okolností a so špecifickými obmedzeniami na klasifikáciu látok a zmesí ako „očných žieravín a silne dráždivých látok“ (1) (2) (3). Na účely tejto testovacej metódy sa silne dráždivé látky vymedzujú ako dráždivé látky vyvolávajúce očné lézie, ktoré u králikov pretrvávajú najmenej 21 dní po podaní. Hoci sa nepovažuje za platnú a plnohodnotnú náhradu *in vivo* testu králičích očí, na účely regulačnej klasifikácie a označovania v rámci určitej sféry použiteľnosti sa odporúča používať testovaciu metódu zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky ako súčasť stratégie postupného testovania (4) (5). Testované látky a zmesi (6) možno klasifikovať ako očné žieraviny alebo silne dráždivé látky bez ďalšieho testovania na králikoch. Látka, ktorej testovanie je negatívne, by sa musela testovať na králikoch s využitím stratégie sekvenčného testovania, ako sa ustanovuje v usmernení OECD pre testy 405 (7) (kapitola B.5 tejto prílohy).

2. Účelom tejto metódy je opis postupov, ktoré sa používajú na posudzovanie možnej očnej žieravosti alebo silnej dráždivosti testovanej látky meraním jej schopnosti vyvolať zákal a zvýšenú priepustnosť v izolovanej hovädzej rohovke. Toxické účinky na rohovku sa merajú: i) zníženým prestupom svetla (zákal) a ii) zvýšeným prechodom farbiva fluoresceínu sodného (priepustnosť). Hodnotenia zákalu a priepustnosti rohovky po vystavení pôsobeniu testovanej látky sa zlúčia a odvodí sa hodnotiace číslo *in vitro* (*In Vitro* Irritancy Score, ďalej len „IVIS“), ktoré sa používa na klasifikáciu úrovne dráždivosti testovanej látky.

3. Očné dráždivé látky vyvolávajúce lézie, ktoré ustúpia za menej ako 21 dní, a nedráždivé látky sa takisto testovali s využitím testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky. Presnosť a spoľahlivosť testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky pre látky v týchto kategóriách sa však formálne neposudzovala.

4. Vymedzenie pojmov sa uvádza v dodatku 1.

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

5. Táto testovacia metóda vychádza z protokolu testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky medziagentúrneho koordinačného výboru pre overovanie alternatívnych metód (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods, ďalej len „ICCVAM“) (8), ktorý bol vytvorený podľa medzinárodnej hodnotiacej štúdie (4)(5)(9) s príspevkami od Európskeho centra pre validáciu alternatívnych metód a japonského centra pre overovanie alternatívnych metód. Tento protokol vychádza z informácií získaných od Inštitútu pre vedy *in vitro* a z protokolu INVITTOX 124 (10), ktorý predstavuje protokol používaný pri rozbore predbežnej hodnotiacej štúdie testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky, ktorú financovalo Európske spoločenstvo a ktorá prebehla v rokoch 1997 –1998. Obidva protokoly vychádzajú z metodiky rozboru testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky, ktorú prvýkrát zverejnil Gautheron a kolektív (11).

▼M2

6. Zistené obmedzenia tejto testovacej metódy vychádzajú z vysokých mier falošnej pozitivity na alkoholy a ketóny a z vysokej miery falošnej negativity na tuhé látky zaznamenané v overovacej databáze (pozri odsek 44) (5). Keď sa látky týchto chemických a fyzikálnych tried vylúčia z databázy, presnosť testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky v klasifikačných systémoch EÚ, Agentúry na ochranu životného prostredia (ďalej len „EPA“) a Globálneho harmonizovaného systému klasifikácie a označovania chemických látok a zmesí (ďalej len „GHS“) sa výrazne zlepší (5). Vzhľadom na účely tohto rozboru (t. j. iba na zisťovanie očných žieravín/silne dráždivých látok) nie sú miery falošnej negativity rozhodujúce, pretože takéto látky by sa následne testovali na králikoch alebo inými vhodne overenými testami *in vitro* v závislosti od regulačných požiadaviek s použitím stratégie sekvenčného testovania, ktorá vychádza z prístupu podľa závažnosti dôkazov. Okrem toho aktuálna overovacia databáza neumožňuje primerané posúdenie niektorých chemických tried alebo tried výrobkov (napr. zmesí). Výskumníci by však mohli zvážiť použitie tejto testovacej metódy pre všetky druhy testovaných materiálov (vrátane zmesí), pričom pozitívny výsledok by sa mohol akceptovať ako údaj, ktorý naznačuje reakciu vo forme očnej žieravosti alebo silného podráždenia. Pozitívny výsledok získaný pre alkoholy alebo ketóny by sa však mal interpretovať opatrne pre riziko nadsadenej predpovede.

7. Všetky postupy s hovädzími očami a s hovädzími rohovkami by mali zodpovedať platným nariadeniam pre dané testovacie zariadenie a postupom na narábanie s materiálom živočíšneho pôvodu, medzi ktoré, okrem iných, patria tkanivá a tkanivové tekutiny. Odporúčajú sa všeobecne platné laboratórne bezpečnostné opatrenia (12).

8. Obmedzením tejto testovacej metódy je, že i keď sa pri nej zohľadňujú niektoré účinky na oči, ktoré sa posudzujú metódou testovania očnej dráždivosti králikov, a do istej miery aj ich závažnosť, neprihliada sa na poškodenia spojiviek a dúhovky. I keď sa vratnosť lézií rohovky nemôže pri rozbore zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky posudzovať samostatne, na základe štúdií očí králikov sa takisto podal návrh, aby sa hodnotenie počiatočnej hĺbky poškodenia rohovky mohlo používať na rozlišovanie nevratných a vratných účinkov (13). A napokon, testovanie zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky neumožňuje vykonať hodnotenie potenciálnej systémovej toxicity súvisiacej s expozíciou očí.

9. Práce na charakterizovaní použiteľnosti a obmedzení rozboru zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky pri zisťovaní slabo dráždivých a nedráždivých látok (pozri aj odsek 45) pokračujú. Používateľom sa takisto odporúča, aby poskytli vzorky a/alebo údaje hodnotiacim organizáciám na formálne posúdenie možných budúcich spôsobov použitia testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky aj na zisťovanie slabo dráždivých a nedráždivých látok.

10. V každom laboratóriu, ktoré prvýkrát zavádza tento rozbor, by sa mali použiť chemikálie na preukázanie spôsobilosti uvedené v dodatku 2. Laboratórium môže použiť tieto chemikálie na preukázanie svojej technickej spôsobilosti na vykonávanie testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky prv, ako predloží údaje z rozboru zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky na účely klasifikácie nebezpečenstva podľa predpisov.

PRINCÍP TESTU

11. Testovacia metóda zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky je organotypický model, ktorý poskytuje krátkodobé zachovanie normálnej fyziologickej a biochemickej funkcie hovädzej rohovky *in vitro*. Pri tejto testovacej metóde sa poškodenie testovanou látkou hodnotí kvantitatívnymi meraniami zmien zákalu a priepustnosti rohovky opacitometrom, resp. spektrofotometrom vo viditeľnej oblasti svetla. Obidve merania sa používajú na výpočet hodnotiaceho čísla *in vitro*, ktoré sa používa na priradenie klasifikačnej kategórie nebezpečenstva podráždenia *in vitro* na predvídanie schopnosti testovanej látky vyvolať očné podráždenie *in vivo* (pozri časť Rozhodovacie kritériá).

▼M2

12. V testovacej metóde zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky sa používajú izolované rohovky z očí čerstvo zabitých zvierat. Zákal rohovky sa kvantitatívne meria ako množstvo svetla prepusteného cez rohovku. Priepustnosť sa kvantitatívne stanovuje ako množstvo farbiva fluoresceínu sodného, ktoré prejde cez celú hrúbku rohovky, a meria sa v médiu zadnej komory. Testované látky sa nanášajú na epiteliálny povrch rohovky pridaním do prednej komory držiaka rohovky. Dodatok 3 obsahuje opis a schému držiaka rohovky, ktorý sa používa v testovacej metóde zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky. Držiaky rohovky sa dajú zakúpiť z rôznych zdrojov alebo sa dajú zhotoviť.

Zdroj a vek hovädzích očí a výber druhov zvierat

13. Dobytok odoslaný na bitúnky sa zvyčajne zabíja pre ľudskú spotrebu alebo pre iné komerčné spôsoby použitia. Ako zdroj rohoviek pre testovanie zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky sa používajú iba zdravé zvieratá, ktoré sa považujú za vhodné na vstup do ľudského potravinového reťazca. Keďže rozsah hmotnosti dobytka je široký v závislosti od spôsobu chovu, veku a pohlavia, neexistuje žiadne odporúčanie pre hmotnosť zvieraťa v čase zabitia.

14. Pri použití očí zo zvierat v rôznom veku môžu byť rozmery rohoviek rôzne. Rohovky s vodorovným priemerom > 30,5 mm a s hodnotami stredovej hrúbky rohovky ≥ 1 100 μm sa vo všeobecnosti získavajú z dobytka staršieho ako osem rokov, zatiaľ čo rohovky s vodorovným priemerom < 28,5 mm a s hodnotami stredovej hrúbky rohovky < 900 μm sa vo všeobecnosti získavajú z dobytka mladšieho ako päť rokov (14). Z toho dôvodu sa oči dobytka staršieho ako 60 mesiacov zvyčajne nepoužívajú. Oči dobytka mladšieho ako 12 mesiacov sa takisto tradične nepoužívajú, pretože tieto oči sa ešte vyvíjajú a hrúbka rohovky a priemer rohovky sú značne menšie, ako sa uvádza v prípade očí dospelého dobytka. Použitie rohoviek mladých zvierat (t. j. 6 až 12 mesačných) je však prípustné, pretože to má niekoľko výhod, ako je vyššia dostupnosť, užší vekový interval a menšie nebezpečenstvo súvisiace s potenciálnym vystavením pracovníkov bovinnej spongiformnej encefalopatii (15). Keďže ďalšie posúdenie vplyvu veľkosti alebo hrúbky rohovky na schopnosť reagovať na žieravé a dráždivé látky by bolo prínosné, odporúča sa, aby používatelia oznámili odhadovaný vek a/alebo hmotnosť zvierat, od ktorých rohovky použité v štúdii pochádzajú.

Odber a doprava očí do laboratória

15. Odber očí vykonávajú zamestnanci bitúnkov. V snahe minimalizovať mechanické a iné druhy poškodenia očí by sa oči mali vylúpnuť čo najskôr po zabití. Zamestnanci bitúnkov by pri oplachovaní hlavy zvieraťa nemali použiť žiadny detergent, aby sa predišlo vystaveniu očí pôsobeniu potenciálne dráždivých látok.

16. Oči by sa mali úplne ponoriť do Hankovho vyváženého soľného roztoku (ďalej len „HBSS“) v nádrži vhodnej veľkosti a dopraviť do laboratória takým spôsobom, aby sa minimalizovalo poškodenie a/alebo kontaminácia baktériami. Keďže odber očí sa vykonáva počas zabíjania, tieto oči môžu byť vystavené styku s krvou alebo inými biologickými látkami vrátane baktérií a iných mikroorganizmov. Preto je dôležité minimalizovať nebezpečenstvo kontaminácie (napr. uložením nádrže s očami na ľad, pridaním antibiotík do HBSS, ktorý sa používa na skladovanie očí pri preprave [napr. dávkou penicilínu 100 IU/ml a streptomycínu 100 mg/ml]).

▼M2

17. Časový interval medzi odberom očí a použitím rohoviek na testovanie zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky by sa mal minimalizovať (zvyčajne sa odber a použitie vykoná v jednom dni) a mal by byť preukázateľný, aby sa nedali spochybniť výsledky rozboru. Základom pre tieto výsledky sú výberové kritériá na oči, ako aj reakcie pri pozitívnej a negatívnej kontrole. Všetky oči použité na rozbor by mali byť z jednej skupiny očí pochádzajúcich z odberu v určitý deň.

Výberové kritériá na oči používané na testovanie zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky

18. Keď sa oči dopravia do laboratória, pozorne sa prekontrolujú s ohľadom na poškodenia vrátane zvýšeného zákalu, škrabancov a prekrvenia. Môžu sa použiť iba rohovky z očí bez takýchto chýb.

19. V ďalších krokoch rozboru sa takisto posudzuje kvalita každej rohovky. Rohovky, ktoré majú po prvej hodine ustaľovania zákal väčší ako sedem zákalových jednotiek, sa majú vyradiť (POZNÁMKA: opacitometer by sa mal kalibrovať podľa noriem zákalu, ktoré sa používajú na stanovenie zákalových jednotiek, pozri dodatok 3).

20. Skupina pre každú úpravu (testovaná látka, súbežné negatívne a pozitívne kontroly) sa skladá minimálne z troch očí. Tri rohovky by sa mali použiť na negatívnu kontrolu pri rozbore testovania zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky. Keďže odobrané rohovky pochádzajú z celých očných gulí a tieto sa inštalujú do komôr na rohovky, existuje tu možnosť, že táto manipulácia môže ovplyvniť jednotlivé hodnoty zákalu a priepustnosti rohovky (vrátane negatívnej kontroly). Okrem toho hodnoty zákalu a priepustnosti rohoviek z negatívnej kontroly sa používajú na korigovanie testovaného predmetu a hodnoty zákalu a priepustnosti rohoviek z pozitívnej kontroly pri výpočtoch IVIS.

POSTUP

Príprava očí

21. Rohovky bez chýb sa vyrežú s 2 až 3 mm prúžkom skléry, ktorá pomáha pri následnej manipulácii, pričom sa postupuje opatrne, aby nedošlo k poškodeniu epitelu a endotelu rohovky. Oddelené rohovky sa nainštalujú do špeciálne navrhnutých držiakov rohovky pozostávajúcich z prednej a zadnej priehradky, ktoré sa dotýkajú epiteliálnej, resp. endoteliálnej strany rohovky v uvedenom poradí. Obidve komory sa naplnia prebytkom predhriateho minimálneho základného média Eagle (Eagle's Minimum Essential Medium, ďalej len „EMEM“) (najprv zadná komora), čím sa zabezpečí, že sa nevytvoria žiadne bubliny. Zariadenie sa potom ustaľuje pri teplote 32 ± 1 °C aspoň jednu hodinu, čím sa umožní, aby sa rohovky dostali do rovnováhy s médiom a dosiahli bežnú metabolickú aktivitu v najväčšej možnej miere (približná teplota povrchu rohovky *in vivo* je 32 °C).

22. Po dobe ustaľovania sa do obidvoch komôr pridá čerstvé predhriate EMEM a pre každú rohovku sa odčítajú základné údaje o zákale. Všetky rohovky, ktoré vykazujú makroskopické poškodenie tkaniva (napr. škrabance, pigmentáciu, neovaskularizáciu) alebo zákal > 7 zákalových jednotiek, sa vyradia. Vypočítajú sa priemerné hodnoty zákalu všetkých ustálených rohoviek. Minimálne tri rohovky s hodnotami zákalu blízkymi strednej hodnote všetkých rohoviek sa vyberú ako rohovky na negatívnu kontrolu (alebo kontrolu rozpúšťadla). Zvyšné rohovky sa potom rozdelia do skupín na úpravu a pozitívnu kontrolu.

▼M2

23. Keďže tepelná kapacita vody je vyššia ako tepelná kapacita vzduchu, voda poskytuje stabilnejšie teplotné podmienky inkubácie. Preto sa odporúča použiť vodný kúpeľ na udržiavanie držiaka rohovky a jeho obsahu na teplote 32 ± 1 °C. Vzdušné inkubátory sa však takisto môžu používať, pričom sa predpokladajú opatrenia na udržiavanie stabilnej teploty (napr. predhriatím držiakov a médií).

Nanesenie testovanej látky

24. Používajú sa dva rôzne protokoly na úpravu, jeden na kvapaliny a povrchovo aktívne látky (tuhé látky alebo kvapaliny) a jeden na povrchovo neaktívne tuhé látky.

25. Kvapaliny sa testujú nezriedené, zatiaľ čo povrchovo aktívne látky sa testujú pri koncentrácii 10 % m/V v 0,9 % roztoku chloridu sodného, v destilovanej vode alebo v inom rozpúšťadle, o ktorom sa preukázalo, že nemá žiadne nepriaznivé účinky na testovací systém. Polotuhé látky, pasty a vosky sa zvyčajne testujú ako kvapaliny. Pre alternatívne koncentrácie zriedenia by sa mali uviesť príslušné dôvody. Rohovky sa vystavia pôsobeniu kvapalín a povrchovo aktívnych látok počas 10 minút. Pri použití inej dĺžky expozície by sa malo uviesť primerané vedecké zdôvodnenie.

26. Povrchovo neaktívne tuhé látky sa zvyčajne testujú ako roztoky alebo suspenzie s koncentráciou 20 % v 0,9 % roztoku chloridu sodného, v destilovanej vode alebo v inom rozpúšťadle, o ktorom sa preukázalo, že nemá žiadne nepriaznivé účinky na testovací systém. Za určitých okolností a pri riadnom vedeckom zdôvodnení sa tuhé látky môžu testovať aj čisté priamym nanesením na povrch rohovky s použitím metódy otvorenej komory (pozri odsek 29). Rohovky sa vystavia pôsobeniu tuhých látok na štyri hodiny, ale podobne ako pri kvapalinách a povrchovo aktívnych látkach môžu sa použiť iné dĺžky expozície s primeraným vedeckým zdôvodnením.

27. V závislosti od fyzikálnej povahy a chemických vlastností (napr. tuhé látky, kvapaliny, viskózne či neviskózne kvapaliny) testovanej látky sa môžu používať rôzne metódy úpravy. Najdôležitejšie je zabezpečiť, aby testovaná látka primerane pokrývala epiteliálny povrch a aby sa pri oplachovaní primerane odstránila. Metóda uzavretej komory sa zvyčajne používa na neviskózne až mierne viskózne kvapalné testované látky, zatiaľ čo metóda otvorenej komory sa zvyčajne používa na poloviskózne a viskózne kvapalné testované látky a na čisté tuhé látky.

28. Pri metóde uzavretej komory sa do prednej komory cez dávkovacie otvory na hornej strane komory zavedie dostatočné množstvo testovanej látky (750 µl) tak, aby sa ňou pokryla epiteliálna strana rohovky, a otvory komory sa následne uzavrú zátkami na čas expozície. Dôležité je zabezpečiť, aby každá rohovka bola vystavená pôsobeniu testovanej látky počas primeraného obdobia.

29. Pri metóde otvorenej komory sa pred úpravou vyberie prstencový zámok okna a sklenené okno z prednej komory. Kontrolná alebo testovaná látka (750 µl alebo dostatočné množstvo testovanej látky na úplné pokrytie rohovky) sa nanesie priamo na epiteliálny povrch rohovky pomocou mikropipety. Ak sa testovaná látka ťažko pipetuje, môže sa na uľahčenie dávkovania naplniť do piestovej pipety pod tlakom. Špička piestovej pipety sa vloží do dávkovacieho hrotu striekačky tak, aby sa materiál mohol zaviesť do vytláčacieho hrotu pod tlakom. Súčasne s posúvaním piestu pipety nahor sa tlačí na piest striekačky. Ak sa v špičke pipety objavia vzduchové bubliny, testovaný materiál sa odstráni (vytlačí) a postup sa opakuje, pokiaľ sa špička nenaplní bez vzduchových bublín. Ak je potrebné, môže sa použiť obyčajná striekačka (bez ihly), pretože umožňuje odmerať presný objem testovanej látky a jej ľahšie nanesenie na epiteliálny povrch rohovky. Po dávkovaní sa sklenené okno vráti na svoje miesto v prednej komore a tým sa systém znova uzavrie.

▼M2

Poexpozičná inkubácia

30. Po uplynutí expozičného obdobia sa testovaná látka, látka na negatívnu kontrolu alebo na pozitívnu kontrolu odstránia z prednej komory a epitel sa prepláchne aspoň trikrát (alebo pokiaľ nie sú viditeľné žiadne znaky prítomnosti testovanej látky) s EMEM (obsahujúcim fenolovú červeň). Médium s obsahom fenolovej červene sa používa na oplachovanie, lebo zmena farby fenolovej červene sa môže monitorovať, čím sa zistí účinnosť oplachovania kyslých alebo zásaditých materiálov. Rohovky sa umývajú viac ako trikrát, pokiaľ je farba fenolovej červene zmenená (na žltú alebo fialovú) alebo je testovaná látka stále viditeľná. Keď médium neobsahuje testovanú látku, rohovky sa opláchnu posledný krát s EMEM (bez fenolovej červene). EMEM (bez fenolovej červene) sa používa na konečné opláchnutie, aby sa zabezpečilo odstránenie fenolovej červene z prednej komory pred meraním zákalu. Predná komora sa potom znova naplní čerstvým EMEM bez fenolovej červene.

31. V prípade kvapalín alebo povrchovo aktívnych látok sa rohovky po opláchnutí inkubujú ďalšie dve hodiny pri teplote 32 ± 1 °C. Dlhší poexpozičný čas môže byť za určitých podmienok užitočný a mohlo by sa o ňom v jednotlivých prípadoch uvažovať. Rohovky upravené tuhou látkou sa na konci štvorhodinového expozičného obdobia dôkladne opláchnu, ale nevyžaduje sa ďalšia inkubácia.

32. Na konci poexpozičného inkubačného obdobia, v prípade kvapalín a povrchovo aktívnych látok, a na konci štvorhodinového expozičného obdobia, v prípade povrchovo neaktívnych tuhých látok, sa zaznamená zákal a priepustnosť každej rohovky. Každá rohovka sa takisto vizuálne prehliadne a prípadné pozorovania sa zaznamenajú (napr. zlupovanie tkaniva, zvyšky testovanej látky, vzorky s nerovnomerným zákalom). Tieto pozorovania by mohli byť dôležité, lebo sa môžu prejaviť v kolísaní údajov opacitometra.

Kontrolné látky

33. Súbežné negatívne kontroly alebo kontroly rozpúšťadla/nosiča a pozitívne kontroly sú súčasťou každého pokusu.

34. Keď sa testuje kvapalná látka s koncentráciou 100 %, do testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky sa začleňuje súbežná negatívna kontrola (napr. 0,9 % roztok chloridu sodného alebo destilovaná voda), aby sa dali zistiť nešpecifické zmeny v testovacom systéme a aby sa poskytol základ na koncové body rozboru. Tým sa takisto zabezpečuje, aby v dôsledku podmienok rozboru nedošlo k neprimeranej reakcii vo forme podráždenia.

35. Keď sa testuje zriedená kvapalina, povrchovo aktívna látka alebo tuhá látka, do testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky sa začleňuje súbežná kontrolná skupina rozpúšťadla/nosiča, aby sa dali zistiť nešpecifické zmeny v testovacom systéme a aby sa poskytol základ na koncové body rozboru. Môže sa použiť iba také rozpúšťadlo/nosič, u ktorého sa preukázalo, že nemá žiadne nepriaznivé účinky na testovací systém.

36. Do každého pokusu sa začleňuje nejaká známa očná dráždivá látka ako súbežná pozitívna kontrola a tým sa overuje vyvolanie primeranej reakcie. Keďže rozbor zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky sa používa v tejto testovacej metóde na zisťovanie žieravých alebo silne dráždivých látok, v ideálnom prípade by sa na pozitívnu kontrolu mala použiť referenčná látka, ktorá v tejto testovacej metóde vyvoláva závažnú reakciu. V snahe zabezpečiť možnosť vyhodnotiť premenlivosť reakcie pri pozitívnej kontrole v čase by však závažnosť dráždivej reakcie nemala byť extrémne silná.

37. Príklady pozitívnych kontrol na kvapalné testované látky sú dimetylformamid alebo 1 % hydroxid sodný. Príkladom pozitívnej kontroly na tuhé testované látky je 20 % (hmotnosť na objem) roztok imidazolu v 0,9 % roztoku chloridu sodného.

▼M2

38. Referenčné látky sú užitočné na posudzovanie potenciálu očnej dráždivosti neznámych chemikálií určitej chemickej triedy alebo triedy výrobkov alebo na posudzovanie potenciálu pomernej dráždivosti očnej dráždivej látky v rámci určitého rozsahu dráždivých reakcií.

Namerané koncové body

39. Zákal určuje množstvo svetla prepusteného cez rohovku. Zákal rohovky sa kvantitatívne meria pomocou opacitometra a výsledkom sú hodnoty zákalu merané na spojitej stupnici.

40. Priepustnosť určuje množstvo farbiva fluoresceínu sodného, ktoré prejde cez všetky bunkové vrstvy rohovky (t. j. od epitelu na vonkajšom povrchu rohovky cez endotel na vnútornom povrchu rohovky). 1 ml roztoku fluoresceínu sodného (4 alebo 5 mg/ml, keď sa testujú kvapaliny a povrchovo aktívne látky, resp. povrchovo neaktívne tuhé látky) sa pridá do prednej komory držiaka rohovky, ktorá sa dotýka epiteliálnej strany rohovky, zatiaľ čo zadná komora, ktorá sa dotýka endoteliálnej strany rohovky, sa naplní čerstvým EMEM. Držiak sa potom inkubuje vo vodorovnej polohe počas 90 ± 5 minút pri teplote 32 ± 1 °C. Množstvo fluoresceínu sodného, ktorý prejde do zadnej komory, sa kvantitatívne odmeria pomocou ultrafialovej/viditeľnej spektrofotometrie. Spektrofotometrické merania stanovené pri 490 nm sa zaznamenajú ako hodnoty optickej hustoty (OD_{490}) alebo absorbancie, ktoré sa merajú na spojitej stupnici. Hodnoty priepustnosti fluoresceínu sa stanovia z hodnôt OD_{490} nameraných spektrofotometrom pri viditeľnom svetle s použitím štandardnej optickej dĺžky 1 cm.

41. Alternatívne sa môže použiť snímač 96-jamkových mikrotitračných platní za predpokladu, že i) je možné vytvoriť lineárny rozsah snímača platní na stanovenie hodnôt OD_{490} pre fluoresceín a ii) použijú sa správne objemy vzoriek fluoresceínu na 96-jamkovej platničke, aby výsledkom boli hodnoty OD_{490}, ktoré sa rovnajú štandardnej optickej dĺžke 1 cm (to by mohlo vyžadovať kompletné naplnenie jamky [obyčajne 360ml]).

ÚDAJE A SPRÁVA

Vyhodnotenie údajov

42. Keď sa vykoná korekcia hodnôt zákalu a priemernej priepustnosti (OD_{490}) vzhľadom na zákal pozadia a hodnoty priepustnosti OD_{490} negatívnej kontroly, priemerné hodnoty zákalu a priepustnosti OD_{490} pre každú upravenú skupinu by sa mali dosadiť do empiricky odvodeného vzorca na výpočet hodnotiaceho čísla dráždivosti *in vitro* (ďalej len „IVIS“) pre každú upravenú skupinu takto:

$$\text{IVIS} = \text{priemerná hodnota zákalu} + (15 \times \text{priemerná hodnota priepustnosti } OD_{490})$$

Sina a kol. (16) oznámili, že tento vzorec bol odvodený pri vnútrolaboratórnych a medzilaboratórnych štúdiách. Údaje vypočítané na súbor 36 zlúčenín v rámci štúdie za účasti viacerých laboratórií sa podrobili analýze podľa viacerých náhodných premenných s cieľom určiť rovnicu, ktorá by najlepšie vyjadrovala vzťah medzi údajmi *in vivo* a *in vitro*. Túto analýzu vykonali vedci v dvoch nezávislých spoločnostiach a odvodili takmer totožné rovnice.

43. Hodnoty zákalu a priepustnosti by sa mali posudzovať aj samostatne, aby sa zistilo, či testovaná látka vyvolala žieravý účinok, alebo silné podráždenie iba prostredníctvom jednej z dvoch koncových hodnôt (pozri Rozhodovacie kritériá).

▼M2

Rozhodovacie kritériá

44. Látka, ktorá vyvoláva IVIS ≥ 55,1, sa vymedzuje ako žieravá alebo silne dráždivá. Ako sa uvádza v odseku 1, ak sa testovaná látka nepreukáže ako očná žieravina alebo silne dráždivá látka, malo by sa vykonať ďalšie testovanie na účely klasifikácie a označovania. Testovacia metóda zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky má celkovú presnosť 79 % (113/143) až 81 % (119/147), mieru falošnej pozitivity 19 % (20/103) až 21 % (22/103) a mieru falošnej negativity 16 % (7/43) až 25 % (10/40) v porovnaní s údajmi metódy na testovanie očí králikov *in vivo* klasifikovanej podľa klasifikačného systému EPA (1), EÚ (2) alebo GHS (3). Keď sa látky v rámci určitých chemických tried (t. j. alkoholy, ketóny) alebo fyzikálnych tried (t. j. tuhé látky) vylúčia z databázy, presnosť testovania zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky v klasifikačných systémoch EÚ, EPA a GHS je v rozsahu 87 % (72/83) až 92 % (78/85), miera falošnej pozitivity je v rozsahu 12 % (7/58) až 16 % (9/56) a miera falošnej negativity je v rozsahu 0 % (0/27) až 12 % (3/26).

45. Aj keď sa nezíska klasifikácia očnej žieravosti alebo silnej dráždivosti testovanej látky, údaje testovania zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky môžu byť užitočné v spojení s testovacími údajmi z testu očí králikov *in vivo* alebo z vhodne overeného testu *in vitro* na ďalšie posúdenie použiteľnosti a obmedzení testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky na zisťovanie slabo dráždivých alebo nedráždivých látok (usmernenie na používanie testovacích metód očnej toxicity *in vitro* je v štádiu vývoja).

Kritériá prijateľnosti štúdie

46. Test sa považuje za prijateľný, ak výsledkom pozitívnej kontroly je IVIS, ktoré patrí do rozsahu dvoch štandardných odchýlok aktuálneho historického priemeru, ktorý sa má aktualizovať najmenej každé tri mesiace alebo vždy, keď sa vykoná nejaký prijateľný test v laboratóriách, kde sa testy vykonávajú zriedkavo (t. j. menej ako jedenkrát za mesiac). Výsledkom reakcií negatívnej kontroly alebo kontroly rozpúšťadla/nosiča by mali byť hodnoty zákalu a priepustnosti, ktoré sú menšie ako stanovené horné hranice hodnôt zákalu a priepustnosti pozadia pre hovädzie rohovky upravené príslušnou negatívnou kontrolou alebo kontrolou rozpúšťadla/nosiča.

Správa o testovaní

47. Správa o testovaní by mala obsahovať tieto informácie, ak sú dôležité na vykonanie štúdie:

Testované a kontrolné látky

Názov chemikálie (názvy chemikálií), ako je štrukturálny názov, ktorý používa služba Chemical Abstracts Service (ďalej len „CAS“), po ktorom nasledujú iné názvy, ak sú známe;

registračné číslo CAS, ak je známe;

čistota a zloženie látky alebo zmesi (v hmotnostných percentách), pokiaľ je táto informácia k dispozícii;

fyzikálno-chemické vlastnosti, ako je fyzikálny stav, prchavosť, pH, stabilita, chemická trieda, rozpustnosť vo vode dôležitá na vykonanie štúdie;

prípadná úprava testovaných/kontrolných látok pred testovaním (napr. zahrievanie, drvenie);

stabilita, ak je známa.

▼M2

Informácie týkajúce sa objednávateľa a testovacieho zariadenia

Meno a adresa objednávateľa, testovacieho zariadenia a vedúceho štúdie;

identifikácia zdroja očí (t. j. zariadenie, v ktorom sa vykonal ich odber);

podmienky skladovania a dopravy očí (napr. dátum a čas odberu očí, časový interval pred začiatkom testovania, dopravné médiá a teplotné podmienky, všetky použité antibiotiká);

osobitné charakteristiky zvierat, od ktorých sa vykonal odber očí (napr. vek, pohlavie, hmotnosť darcovského zvieraťa), ak sú k dispozícii.

Zdôvodnenie testovacej metódy a použitý protokol

Integrita testovacej metódy

Postup, ktorý sa používa na zabezpečenie integrity (t. j. presnosti a spoľahlivosti) testovacej metódy v čase (napr. pravidelné testovanie látok na preukázanie spôsobilosti, používanie historických negatívnych a pozitívnych kontrolných údajov).

Kritériá na prijateľný test

Prijateľné rozsahy súbežnej pozitívnej a negatívnej kontroly na základe historických údajov;

prijateľné rozsahy prípadných súbežných referenčných kontrol na základe historických údajov.

Podmienky testovania

Opis použitého testovacieho systému;

použitý typ držiaka rohovky;

informácie o kalibrácii zariadení použitých na meranie zákalu a priepustnosti (napr. opacitometra a spektrofotometra);

informácie o použitých hovädzích rohovkách, vrátane prehlásenia o ich kvalite;

podrobnosti o použitom testovacom postupe;

koncentrácia (koncentrácie) použitej testovanej látky (látok);

opis všetkých úprav testovacieho postupu;

odkaz na historické údaje modelu (napr. negatívne a pozitívne kontroly, látky na preukázanie spôsobilosti, referenčné látky);

opis použitých hodnotiacich kritérií.

Výsledky

Tabuľka údajov o jednotlivých testovaných vzorkách (napr. hodnoty zákalu a OD_{490} a vypočítané IVIS na testované látky a pozitívne, negatívne a referenčné kontroly [ak sú zahrnuté] uvedené vo forme tabuliek, vrátane údajov z prípadných replikovaných a opakovaných pokusov a priemerné hodnoty ± štandardná odchýlka pre každý pokus);

opis iných pozorovaných účinkov.

Diskusia

Záver

LITERATÚRA

(1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual (Príručka na kontrolu označení): 2. vydanie. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency (Agentúra USA pre ochranu životného prostredia).

▼M2

(2) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene a doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006. Ú. v. EÚ L 353, 31.12.2008, s. 1.

(3) OSN (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) [Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií (ďalej len „GHS“)]. Druhé prepracované vydanie, New York a Ženeva: United Nations Publications, 2007. Dostupné na:

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html]

(4) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants (Oznámenie o záveroch retrospektívnej štúdie ICCVAM o organotypických rozboroch *in vitro* ako kontrolných testoch na zisťovanie potenciálnych očných žieravín a silne dráždivých látok). Dostupné na:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(5) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives (Správa o hodnotení testovacích metód – testovacie metódy očnej toxicity *in vitro* na zisťovanie očných silne dráždivých a žieravých látok). Medziagentúrny koordinačný výbor pre overovanie alternatívnych metód a národný toxikologický program (ďalej len „NTP“) medziagentúrneho strediska pre overovanie alternatívnych toxikologických metód (ďalej len „NICEATM“). Publikácia NIH č.: 07-4517. Dostupné na:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(6) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 z 18. decembra 2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemikálií (REACH) a o zriadení Európskej chemickej agentúry, o zmene a doplnení smernice 1999/45/ES a o zrušení nariadenia Rady (EHS) č. 793/93 a nariadenia Komisie (ES) č. 1488/94, smernice Rady 76/769/EHS a smerníc Komisie 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES. Ú. v. EÚ L 396, 30.12.2006, s. 1.

(7) OECD (2002). Test Guideline 405 (Usmernenie na testovanie 405). OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion (Usmernenie OECD na testovanie chemikálií. Akútne podráždenie očí/žieravosť). Dostupné na:

[http://www.oecd.org/document/40/
0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.htm l]

(8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol (Protokol testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky odporúčaný výborom ICCVAM). In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives (V: Správa ICCVAM o hodnotení testovacej metódy – testovacie metódy očnej toxicity *in vitro* na zisťovanie očných silne dráždivých látok a žieravín). Medziagentúrny koordinačný výbor pre overovanie alternatívnych metód a národný toxikologický program medziagentúrneho strediska na overovanie alternatívnych toxikologických metód. Publikácia NIH č.: 07-4517. Dostupné na:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(9) ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method (Súčasný stav testovacích metód *in vitro* na zisťovanie očných žieravín a silne dráždivých látok: testovacia metóda zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky). Publikácia NIH č.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Dostupné na:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]

(10) INVITTOX (1999). Protocol 124: Bovine Corneal Opacity and Permeability Assay – SOP of Microbiological Associates Ltd. (Protokol 124: rozbor zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky – ŠPP Microbiological Associates Ltd.), Ispra, Taliansko: Európske centrum pre validáciu alternatívnych metód (ďalej len „ECVAM“).

▼M2

(11) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. a Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy (Testovanie zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky: rozbor dráždivosti očí *in vitro*). *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442 – 449.

(12) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L. a the Health-care Infection Control Practices Advisory Committee (Poradný výbor pre postupy kontroly nákaz v zdravotnej starostlivosti) (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings (Usmernenie na izolačné opatrenia: predchádzanie prenosu pôvodcov nákaz v organizáciách zdravotnej starostlivosti). Dostupné na:

[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf].

(13) Maurer, J.K., Parker, R.D. a Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays (Rozsah poranení rohovky ako mechanický základ podráždenia očí: hlavné zistenia a odporúčania na vývoj alternatívnych rozborov). *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106 – 117.

(14) Doughty, M.J., Petrou, S. a Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse (Anatómia a morfológia rohoviek hovädzích očí z bitúnka). *Can. J. Zool.* 73:2159 – 2165.

(15) Collee, J. a Bradley, R. (1997). BSE: A decade on - Part I (BSE: o desaťročie ďalej – časť I). The Lancet 349:636 – 641.

(16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., a Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates (Spolupráca pri posudzovaní siedmich alternatív k Draize testu dráždivosti očí s použitím farmaceutických medziproduktov). *Fundam Appl Toxicol* 26:20 – 31.

(17) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method (Informačný dokument o kontrole, aktuálny stav testovacích metód *in vitro* na zisťovanie očných žieravín a silne dráždivých látok: testovacia metóda zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky). Dostupné na:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

(18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method. (Informačný dokument o kontrole, aktuálny stav testovacích metód *in vitro* na zisťovanie očných žieravín a silne dráždivých látok: testovacia metóda izolovaného kuracieho oka). Dostupné na:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

▼M2

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: blízkosť zhody výsledkov testovacej metódy s prijatými referenčnými hodnotami. Je to miera výkonnosti testovacej metódy a jeden z aspektov „významnosti“. Tento pojem sa často používa ako zameniteľný s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy.

Referenčná látka: látka, ktorá sa používa ako štandard na porovnávanie s testovanou látkou. Referenčná látka by mala mať tieto vlastnosti: i) stály a spoľahlivý zdroj (zdroje); ii) štrukturálnu a funkčnú podobnosť s triedou látok, ktoré sa testujú; iii) známe fyzikálne/chemické vlastnosti; iv) podporné informácie o známych účinkoch a v) známu účinnosť v rozsahu žiadanej reakcie.

Rohovka: priehľadná časť prednej strany očnej gule, ktorá pokrýva dúhovku a zrenicu a prepúšťa svetlo do vnútra oka.

Zákal rohovky: miera rozsahu zakalenia rohovky po vystavení pôsobeniu testovanej látky. Zvýšený zákal rohovky je príznakom poškodenia rohovky. Zákal sa môže posudzovať subjektívne, ako je to pri Draize teste očí králikov, alebo objektívne pomocou prístroja napr. opacitometra.

Priepustnosť rohovky: kvantitatívne meranie poškodenia epitelu rohovky stanovením množstva farbiva fluoresceínu sodného, ktoré prejde cez všetky bunkové vrstvy rohovky.

EPA kategória 1: žieravé (nevratné zničenie očného tkaniva) alebo postihnutie rohovky alebo podráždenie, ktoré pretrváva viac ako 21 dní (1).

EÚ kategória R41: vznik poškodenia tkaniva v oku alebo závažné fyzické zhoršenie videnia po nanesení testovanej látky na predný povrch oka, ktoré nie je úplne vratné do 21 dní od nanesenia (2).

Miera falošnej negativity: podiel všetkých pozitívnych látok, ktoré sú testovacou metódou nesprávne identifikované ako negatívne. Je to jeden z ukazovateľov výkonnosti testovacej metódy.

Miera falošnej pozitivity: podiel všetkých negatívnych látok, ktoré sú testovacou metódou nesprávne identifikované ako pozitívne. Je jedným z ukazovateľov výkonnosti testovacej metódy.

GHS (globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemických látok): systém navrhovania klasifikácie chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a stupňov fyzických, zdravotných a environmentálnych nebezpečenstiev a označovania pomocou príslušných komunikačných prvkov, ako sú piktogramy, signalizačné slová, upozornenia na nebezpečenstvo, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov na sprostredkovanie informácií o ich nepriaznivých účinkoch s cieľom chrániť ľudí (vrátane zamestnancov, pracujúcich, dopravcov, spotrebiteľov a subjekty zodpovedné za riešenie núdzových situácií) a životné prostredie (3).

▼M2

GHS kategória 1: vznik poškodenia tkaniva v oku alebo závažného fyzického zhoršenia videnia po nanesení testovanej látky na predný povrch oka, ktoré nie je úplne vratné do 21 dní po nanesení (3).

Nebezpečenstvo: vnútorná vlastnosť činidla alebo situácia, ktorá má schopnosť vyvolať nepriaznivé účinky pri vystavení organizmu, systému alebo obyvateľstva (skupiny obyvateľov) pôsobeniu tohto činidla.

Hodnotiace číslo dráždivosti *in vitro* (ďalej len „IVIS“): empiricky odvodený vzorec, ktorý sa používa pri rozbore zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky, pričom sa priemerné hodnoty zákalu a priepustnosti za každú ošetrenú skupinu zlúčia do jediného hodnotiaceho čísla *in vitro* na každú ošetrenú skupinu. *IVIS* = priemerná hodnota zákalu + (15 x priemerná hodnota priepustnosti).

Negatívna kontrola: neupravená replika, ktorá obsahuje všetky zložky testovacieho systému. Táto vzorka sa spracuje so vzorkami upravenými testovanou látkou a s inými kontrolnými vzorkami s cieľom zistiť, či rozpúšťadlo a testovací systém na seba navzájom pôsobia.

Nedráždivá látka: látka, ktorá v EPA kategórii I, II ani III; v EÚ kategórii R41 ani R36 ani v GHS kategórii 1, 2A ani 2B nie je klasifikovaná ako očná dráždivá látka.

Očná žieravina: a) látka, ktorá spôsobuje nevratné poškodenie tkaniva oka; b) látka, ktorá je v GHS kategórii 1, v EPA kategórii I alebo v EÚ kategórii R41 klasifikovaná ako očná žieravina (1) (2) (3).

Očná dráždivá látka: a) látka, ktorá po nanesení na predný povrch oka vyvoláva nevratnú zmenu v oku; b) látka, ktorá je v EPA kategórii II alebo III, v EÚ kategórii R36 alebo v GHS kategórii 2A alebo 2B klasifikovaná ako očná dráždivá látka (1) (2) (3).

Očná silne dráždivá látka: a) látka, ktorá po nanesení na predný povrch oka vyvoláva poškodenie očného tkaniva, ktoré neustúpi do 21 dní po nanesení, alebo spôsobuje závažné fyzické zhoršenie videnia; b) látka, ktorá je v GHS kategórii 1, v EPA kategórii I alebo v EÚ kategórii R41 klasifikovaná ako očná dráždivá látka (1) (2) (3).

Opacitometer: prístroj na meranie „zákalu rohovky“ kvantitatívnym vyhodnotením prestupu svetla cez rohovku. Typický prístroj má dve priehradky, z ktorých každá má vlastný zdroj svetla a fotobunku. Jedna priehradka sa používa na upravenú rohovku, zatiaľ čo druhá sa používa na kalibrovanie a vynulovanie prístroja. Svetlo z halogénovej lampy sa vyšle cez kontrolnú priehradku (prázdna komora bez okien alebo kvapaliny) do fotobunky a porovná sa so svetlom vyslaným do fotobunky cez pokusnú priehradku, v ktorej je umiestnená komora obsahujúca rohovku. Rozdiel v prestupe svetla z fotobuniek sa porovná a na číslicovej zobrazovacej jednotke sa ukáže číselná hodnota zákalu.

Pozitívna kontrola: replika obsahujúca všetky zložky testovacieho systému a upravená látkou, o ktorej sa vie, že vyvoláva pozitívnu reakciu. S cieľom zabezpečiť možnosť vyhodnotiť premenlivosť reakcie pri pozitívnej kontrole v čase by však závažnosť reakcie nemala byť extrémne silná.

▼M2

Spoľahlivosť: miera rozsahu, v ktorom sa testovacia metóda môže opakovane vykonávať v čase v laboratóriu a medzi laboratóriami, pričom sa používa rovnaký protokol. Hodnotí sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti a vnútrolaboratórnej opakovateľnosti.

Kontrola rozpúšťadla/nosiča: neupravená vzorka, ktorá obsahuje všetky zložky testovacieho systému, vrátane rozpúšťadla alebo nosiča, ktorá sa spracuje so vzorkami upravenými testovanou látkou a s inými kontrolnými vzorkami, a zistí sa základná reakcia vzoriek upravených testovanou látkou rozpustenou v tom istom rozpúšťadle alebo nosiči. Keď sa táto vzorka testuje so súbežnou negatívnou kontrolou, preukazuje sa aj to, či rozpúšťadlo, alebo nosič a testovací systém na seba navzájom pôsobia.

Postupné testovanie: stratégia postupného testovania, pri ktorej sa všetky existujúce informácie o testovanej látke kontrolujú v určitom poradí, s použitím postupu posudzovania závažnosti dôkazov v každom stupni a zisťuje sa, či je k dispozícii dostatok informácií na rozhodnutie o klasifikácii nebezpečenstva pred postupom do ďalšieho stupňa. Ak sa dráždivý potenciál testovanej látky môže stanoviť na základe existujúcich informácií, nevyžaduje sa žiadne ďalšie testovanie. Ak dráždivý potenciál testovanej látky nie je možné stanoviť na základe existujúcich informácií, vykonáva sa testovanie metódou postupných krokov na zvieratách, až kým sa nedá urobiť jednoznačná klasifikácia.

Overená testovacia metóda: testovacia metóda, v prípade ktorej sa ukončili hodnotiace štúdie na určenie významnosti (vrátane presnosti) a spoľahlivosti na určitý účel. Je dôležité poznamenať, že overená testovacia metóda nemusí mať dostatočnú výkonnosť z hľadiska presnosti a spoľahlivosti, aby sa mohla považovať za prijateľnú na navrhnutý účel.

Posudzovanie závažnosti dôkazov: postup posudzovania silných a slabých stránok rôznych informácií na dosiahnutie a podporu záveru, pokiaľ ide o potenciál nebezpečnosti nejakej látky.

▼M2

Dodatok 2

Látky na preukazovanie spôsobilosti pre testovaciu metódu zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky

Pred rutinným používaním testovacej metódy, ktorá zodpovedá tejto testovacej metóde, laboratóriá môžu preukázať svoju technickú spôsobilosť správnym stanovením klasifikácie očnej žieravosti 10 látok odporúčaných v tabuľke 1. Výber týchto látok sa vykonal tak, aby zastupovali ten rozsah reakcií lokálneho podráždenia oka/žieravého účinku na oko, ktorý vychádza z výsledkom testov očí králikov *in vivo* (TG 405) (t. j. kategórie 1, 2A, 2B alebo neklasifikované a označené podľa GHS OSN (3) (7). Vzhľadom na overenú použiteľnosť týchto rozborov (t. j. iba na zisťovanie očných žieravín/silne dráždivých látok) tu však existujú len dva výsledky testov na účely klasifikácie (žieravina/silne dráždivá látka alebo nežieravina/slabo dráždivá látka) na preukázanie spôsobilosti. Ďalším kritériom na výber bola komerčná dostupnosť látok, dostupnosť vysoko kvalitných referenčných údajov *in vivo* a existencia vysoko kvalitných údajov z dvoch metód *in vitro*, pre ktoré sa pripravujú usmernenia na testovanie. Z toho dôvodu sa dráždivé látky vybrali zo zoznamu 122 referenčných látok, ktoré odporučil výbor ICCVAM na overovanie testovacích metód očnej toxicity *in vitro* (pozri dodatok H: Referenčné látky odporúčané ICCVAM) (5). Referenčné údaje sú dostupné v podkladových kontrolných dokumentoch ICCVAM pre testovaciu metódu zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky a testovaciu metódu izolovaného kuracieho oka (17) (18).

Tabuľka 1

Odporúčané látky na preukazovanie technickej spôsobilosti na testovanie zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky

Látka	CASRN	Chemická trieda ([1])	Fyzikálna forma	Klasifikácia *in vivo* ([2])	Klasifikácia *in vitro* ([3])
Benzalkónium chlorid (5 %)	8001-54-5	Óniová zlúčenina	Kvapalina	Kategória 1	Žieravá/silne dráždivá látka
Chlórhexidín	55-56-1	Amín, amidín	Tuhá látka	Kategória 1	Žieravá/silne dráždivá látka
Kyselina dibenzoyl-L-vinná	2743-38-6	Karboxylová kyselina, ester	Tuhá látka	Kategória 1	Žieravá/silne dráždivá látka
Imidazol	288-32-4	Heterocyklická zlúčenina	Tuhá látka	Kategória 1	Žieravá/silne dráždivá látka
Kyselina trichlóroctová (30 %)	76-03-9	Karboxylová kyselina	Kvapalina	Kategória 1	Žieravá/silne dráždivá látka
2,6-dichlórbenzoyl chlorid	4659-45-4	Acylhalogenid	Kvapalina	Kategória 2A	Nežieravá/slabo dráždivá látka
Etyl-2-metylacetooctan	609-14-3	Ketón, ester	Kvapalina	Kategória 2B	Nežieravá/slabo dráždivá látka
Dusičnan amónny	6484-52-2	Anorganická soľ	Tuhá látka	Kategória 2A	Nežieravá/slabo dráždivá látka

▼**M2**

Látka	CASRN	Chemická trieda (1)	Fyzikálna forma	Klasifikácia *in vivo* (2)	Klasifikácia *in vitro* (3)
Glycerol	56-81-5	Alkohol	Kvapalina	Neoznačená	Nežieravá/slabo dráždivá látka
n-hexán	110-54-3	Uhľovodík (acyklický)	Kvapalina	Neoznačená	Nežieravá/slabo dráždivá látka

Skratky: CASRN = Registračné číslo Chemical Abstracts Service

(1) Chemické triedy sa stanovili pre každú testovanú látku s použitím štandardnej klasifikačnej schémy na základe klasifikačného systému National Library of Medicine Medical Subject Headings (dostupné na http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Na základe výsledkov testu očí králikov *in vivo* (OECD TG 405) a s použitím GHS OSN (3)(7).

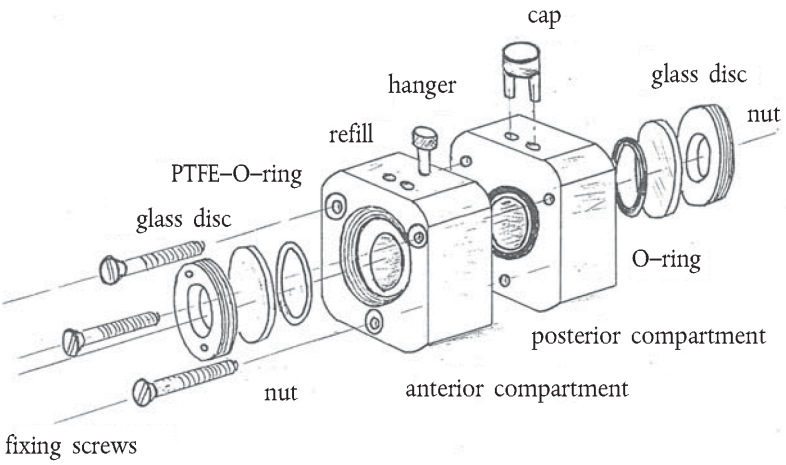
(3) Na základe výsledkov testovania zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky a izolovaného kuracieho oka.

▼M2

Dodatok 3

DRŽIAK ROHOVKY NA TESTOVANIE ZÁKALU A PRIEPUSTNOSTI HOVÄDZEJ ROHOVKY

1. Držiaky rohoviek na testovanie zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky sú vyrobené z inertného materiálu (napr. z polypropylénu). Držiaky sa skladajú z dvoch polovíc (prednej a zadnej komory) a majú dve podobné valcovité vnútorné komory. Obidve komory majú objem 5 ml a sú ukončené sklenеným oknom, cez ktoré sa zaznamenávajú namerané údaje zákalu. Obidve vnútorné komory majú priemer 1,7 cm a hĺbku 2,2 cm ([1]). Tesniaci krúžok umiestnený na zadnej komore sa používa proti presakovaniu cez netesnosti. Rohovky sa umiestňujú endoteliálnou stranou nadol na tesniaci krúžok zadnej komory a predná komora sa položí na epiteliálnu stranu rohovky. Komory sú zafixované na mieste tromi nehrdzavejúcimi skrutkami na vonkajšej hrane komory. Na konci každej komory je sklenené okno, ktoré sa môže vybrať, aby sa zabezpečil ľahší prístupu k rohovke. Tesniaci krúžok sa takisto nachádza medzi sklenеným oknom a komorou a bráni presakovaniu cez netesnosti. Dva otvory na vrchnej strane každej komory umožňujú zavedenie a odstránenie média a testovaných zlúčenín. V čase úpravy a inkubácie sú uzavreté gumovými zátkami.



Glosár

Glass disc:	sklenený kotúč
PTFE-O-ring:	teflónový tesniaci krúžok
Refill:	plniaci otvor
Hanger:	záves
Cap:	zátka
Nut:	matica
O-ring:	tesniaci krúžok
Posterior compartment:	zadná priehradka
Anterior compartment:	predná priehradka
Fixing screws:	fixačné skrutky

([1]) Rozmery sú uvedené pre držiak rohovky, ktorý sa používa pre kravy vo veku 12 až 60 mesiacov. V prípade, že sa používajú 6 až 12-mesačné zvieratá, držiak sa musí navrhnúť tak, aby každá komora mala objem 4 ml a aby každá vnútorná komora mala priemer 1,5 cm a hĺbku 2,2 cm. Pri novom návrhu držiaka rohovky je veľmi dôležité, aby pomer vystavenej plochy povrchu rohovky k objemu zadnej komory bol taký istý ako tento pomer vo zvyčajne používanom držiaku rohovky. Je to potrebné preto, aby sa zabezpečilo správne určenie hodnôt priepustnosti na výpočet IVIS podľa navrhnutého vzorca.

▼**M2**

OPACITOMETER

2. Opacitometer je zariadenie na meranie prestupu svetla. Svetlo z halogénovej lampy sa vyšle cez kontrolnú priehradku (prázdna komora bez okien alebo kvapaliny) do fotobunky a porovná sa so svetlom vyslaným do fotobunky cez pokusnú priehradku, v ktorej je umiestnená komora s rohovkou. Rozdiel v prestupe svetla z fotobuniek sa porovná a číselná hodnota zákalu sa vysvieti na zobrazovacej jednotke. Zákalové jednotky sú stanovené.

3. Opacitometer by mal poskytovať lineárnu reakciu v určitom rozsahu údajov zákalu, ktoré patria do intervalov používaných pre rôzne klasifikácie opísané v prognostickom modeli (t. j. až po interval, ktorým sa určuje žieravosť/silná dráždivosť). V snahe zabezpečiť lineárne a presné údaje až do 75 – 80 zákalových jednotiek je potrebné vykonať kalibráciu opacitometra s použitím súboru kalibračných materiálov. Kalibračné materiály (matné polyesterové fólie) sa vložia do kalibračnej komory (komora na rohovku určená na uloženie kalibračných materiálov) a odčíta sa údaj na opacitometri. Kalibračná komora je navrhnutá tak, aby kalibračné materiály boli v nej uložené približne v rovnakej vzdialenosti medzi svetlom a fotobunkou ako rohovky pri meraní zákalu. Opacitometer sa najprv kalibruje na zákal 0 zákalových jednotiek s použitím kalibračnej komory bez kalibračného materiálu. Potom sa do kalibračnej komory vložia tri rôzne kalibračné materiály po sebe a odmerajú sa zákaly. Výsledkom merania kalibračných materiálov 1, 2 a 3 by mali byť údaje zákalu, ktoré sa rovnajú ich nastaveným hodnotám 75, 150, resp. 225 zákalových jednotiek ± 5 %.

▼M2

B 48 TESTOVACIA METÓDA IZOLOVANÉHO KURACIEHO OKA NA ZISŤOVANIE OČNÝCH ŽIERAVÍN A SILNE DRÁŽDIVÝCH LÁTOK

ÚVOD

1. Testovacia metóda izolovaného kuracieho oka je testovacia metóda *in vitro*, ktorá sa môže používať za určitých okolností a s určitými obmedzeniami na klasifikáciu látok a zmesí ako očných žieravín a silne dráždivých látok (1) (2) (3). Na účely tejto testovacej metódy sa silne dráždivé látky vymedzujú ako látky vyvolávajúce očné lézie, ktoré u králikov pretrvávajú najmenej 21 dní po podaní. I keď sa nepovažuje za platnú a plnohodnotnú náhrada testu králičích očí *in vivo*, odporúča sa používať testovaciu metódu izolovaného kuracieho oka ako súčasť stratégie postupného testovania pre regulačnú klasifikáciu a na označovanie v rámci určitej sféry použiteľnosti (4) (5). Testované látky a zmesi (6), ktoré sú v tomto rozbore pozitívne, možno klasifikovať ako očné žieraviny alebo silne dráždivé látky bez ďalšieho testovania na králikoch. Látka, ktorej testovanie je negatívne, sa musí testovať na králikoch s využitím stratégie sekvenčného testovania, ako sa ustanovuje v usmernení OECD na testy 405 (7) (kapitola B.5 tejto prílohy).

2. Účelom tejto metódy je opísať postupy, ktoré sa používajú na posudzovanie potenciálnej očnej žieravosti alebo silnej dráždivosti testovanej látky meraním jej schopnosti vyvolať toxicitu vo vylúpnutom kuracom oku. Toxické účinky na rohovku sa merajú: i) kvalitatívnym hodnotením zákalu, ii) kvalitatívnym hodnotením poškodenia epitelu na základe nanesenia fluoresceínu do oka (zadržania fluoresceínu), iii) kvantitatívnym meraním zväčšenej hrúbky (zdurenia) a iv) kvalitatívnym posudzovaním makroskopického morfologického poškodenia povrchu. Zákal rohovky, zdurenie a hodnotenie poškodenia po vystavení pôsobeniu testovanej látky sa hodnotia jednotlivo a potom sa zlúčia a odvodí sa klasifikácia očného podráždenia.

3. Očné dráždivé látky vyvolávajúce lézie, ktoré ustúpia za menej ako 21 dní, a nedráždivé látky sa takisto testovali s využitím testovacej metódy izolovaného kuracieho oka. Presnosť a spoľahlivosť testovacej metódy izolovaného kuracieho oka na látky v týchto kategóriách sa však formálne neposudzovala.

4. Vymedzenia sú uvedené v dodatku 1.

POČIATOČNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

5. Táto testovacia metóda vychádza z protokolu testovacej metódy izolovaného kuracieho oka medziagentúrneho koordinačného výboru pre overovanie alternatívnych metód (ďalej len „ICCVAM“) (8), ktorý bol vytvorený podľa medzinárodnej hodnotiacej štúdie (4) (5) (9) s príspevkami od Európskeho centra pre validáciu alternatívnych metód, japonského centra pre overovanie alternatívnych metód a z Odboru toxikológie a aplikovanej farmakológie Organizácie pre aplikovaný prírodovedecký výskum pre kvalitu života (ďalej len „TNO“) (Holandsko). Tento protokol vychádza z informácií získaných zo zverejnených protokolov, ako aj z aktuálneho protokolu, ktorý používa TNO (10) (11) (12) (13) (14).

▼M2

6. Zistené obmedzenia tejto testovacej metódy vychádzajú z vysokej miery falošnej pozitivity na alkoholy a z vysokých mier falošnej negativity na tuhé látky a povrchovo aktívne látky (pozri odsek 47) (4). Keď sa látky týchto chemických a fyzikálnych tried vylúčia z údajovej základne, presnosť testovacej metódy izolovaného kuracieho oka v klasifikačných systémoch EÚ, EPA a GHS sa výrazne zlepší (4). Na základe účelu tohto rozboru (t. j. iba na zisťovanie očných žieravín/silne dráždivých látok) miery falošnej negativity nie sú rozhodujúce, pretože takéto látky sa následne testujú na králikoch alebo inými vhodne overenými testami *in vitro* v závislosti od regulačných požiadaviek s použitím stratégie sekvenčného testovania, ktorá vychádza z prístupu podľa závažnosti dôkazov. Okrem toho aktuálna overovacia databáza neumožňuje primerané posúdenie niektorých chemických tried alebo tried výrobkov (napr. zmesí). Výskumníci by však mohli zvážiť použitie tejto testovacej metódy na testovanie všetkých druhov materiálov (vrátane zmesí), pričom pozitívny výsledok by sa mohol akceptovať ako údaj, ktorý naznačuje reakciu vo forme očnej žieravosti alebo silného podráždenia. Pozitívny výsledok získaný pre alkoholy by sa však mal interpretovať opatrne pre riziko nadsadenej predpovede.

7. Všetky postupy s kuracími očami a s hovädzími rohovkami by mali vyhovovať platným nariadeniam daného testovacieho zariadenia a postupom na narábanie s materiálmi pochádzajúcimi z ľudí alebo zo zvierat, medzi ktoré okrem iných patria tkanivá a tkanivové tekutiny. Odporúčajú sa všeobecne platné laboratórne bezpečnostné opatrenia (15).

8. Obmedzením tejto testovacej metódy je, že i keď sa zohľadňujú niektoré účinky na oči, ktoré sa posudzujú metódou testovania očnej dráždivosti králikov, a do istej miery aj ich závažnosť, neprihliada sa na poškodenia spojiviek a dúhovky. I keď sa samotná vratnosť lézií rohovky nemôže posudzovať testovacou metódou izolovaného kuracieho oka, na základe štúdií očí králikov bol takisto podaný návrh, aby sa hodnotenie počiatočnej hĺbky poškodenia rohovky mohlo používať na rozlišovanie nevratných a vratných účinkov (16). A nakoniec, testovacia metóda izolovaného kuracieho oka neumožňuje vykonať hodnotenie potenciálu pre systémovú toxicitu súvisiacu s expozíciou očí.

9. Pokračujú práce na ďalšom charakterizovaní použiteľnosti a obmedzení testovacej metódy izolovaného kuracieho oka na zisťovanie slabo dráždivých a nedráždivých látok (pozri aj odsek 48). Používateľom sa takisto odporúča, aby poskytli vzorky a/alebo údaje overovacím organizáciám na formálne posúdenie možných budúcich spôsobov použitia testovacej metódy izolovaného kuracieho oka, vrátane zisťovania očných slabo dráždivých a nedráždivých látok.

10. V každom laboratóriu, ktoré prvýkrát zavádza tento rozbor, by sa mali použiť chemikálie na preukázanie spôsobilosti uvedené v dodatku 2. Laboratórium môže použiť tieto chemikálie na preukázanie svojej technickej spôsobilosti na vykonávanie testovacej metódy izolovaného kuracieho oka prv, ako predloží údaje z testovania izolovaného kuracieho oka na účely regulačnej klasifikácie nebezpečenstva.

PRINCÍP TESTU

11. Testovacia metóda izolovaného kuracieho oka je organotypický model, ktorý poskytuje krátkodobé zachovanie kuracieho oka *in vitro*. Pri tejto testovacej metóde sa poškodenie testovanou látkou hodnotí stanovením zdurenia rohovky, zákalu rohovky a zadržania fluoresceínu v rohovke. Zatiaľ čo posledné dva parametre vyžadujú kvalitatívne hodnotenie, analýza zdurenia rohovky poskytuje kvantitatívne hodnotenie. Každé meranie sa prevedie na kvantitatívny údaj, ktorý sa použije na výpočet celkového indexu podráždenia, alebo sa priradí kvalitatívna kategória, ktorá sa použije na priradenie klasifikácie očnej žieravosti a silnej dráždivosti *in vitro*. Každý z týchto výsledkov sa potom môže použiť na predvídanie potenciálu testovanej látky pôsobiť ako žieravina a silne dráždivá látka *in vivo* (pozri Rozhodovacie kritériá).

▼M2

Zdroj a vek kuracích očí

12. Historicky sa na tento rozbor používali oči pochádzajúce z kurčiat z bitúnkov, kde sa zabíjajú na ľudskú spotrebu, čím sa odstránila potreba laboratórnych zvierat. Používajú sa iba oči zo zdravých zvierat, ktoré sa považujú za vhodné na vstup do ľudského potravinového reťazca.

13. I keď sa ešte nevykonala žiadna kontrolovaná štúdia na posúdenie optimálneho veku kurčiat, vek a hmotnosť kurčiat, ktoré sa používajú historicky na túto testovaciu metódu, zodpovedajú veku a hmotnosti jarných kurčiat spracovávaných tradične na hydinových bitúnkoch (t. j. približne 7 týždňov, 1,5 – 2,5 kg).

Odber a doprava očí do laboratória

14. Hlavy by sa mali odoberať hneď po znehybnení kurčiat zvyčajne elektrickým šokom alebo narezaním krku s následným vykrvácaním. Miestny zdroj kurčiat v blízkosti laboratória by mal byť situovaný tak, aby sa hlavy mohli dopraviť z bitúnka do laboratória dostatočne rýchlo, čím sa minimalizuje zhoršenie ich kvality a/alebo kontaminácia baktériami. Časový interval medzi odberom kuracích hláv a použitím očí v testovacej metóde izolovaného kuracieho oka by mal byť čo najmenší (zvyčajne do dvoch hodín) a mal by byť preukázateľný, aby sa nedali spochybniť výsledky rozboru. Základom týchto výsledkov sú výberové kritériá na oči, ako aj reakcie na pozitívne a negatívne kontroly. Všetky oči použité na rozbor by mali byť z jednej skupiny očí pochádzajúcich z odberu v určitý deň.

15. Keďže oči sa odoberajú v laboratóriu, neporušené hlavy sa dopravujú z bitúnka pri teplote okolitého prostredia v plastových boxoch a zvlhčujú sa utierkami namočenými do izotonického fyziologického roztoku.

Výberové kritériá na oči používané na testovanie izolovaného kuracieho oka

16. Oči, ktoré majú po vylúpnutí vysoké počiatočné sfarbenie fluoresceínom (t. j. > 0,5) alebo vysokú hodnotu zakalenia rohovky (t. j. > 0,5), sa vyradia.

17. Každá skupina na úpravu a súbežnú pozitívnu kontrolu sa skladá najmenej z troch očí. Skupina na negatívnu kontrolu alebo na kontrolu rozpúšťadla (ak sa používa iné rozpúšťadlo ako fyziologický roztok) obsahuje minimálne jedno oko.

POSTUP

Príprava očí

18. Očné viečka sa opatrne odrežú, pričom sa dbá na to, aby sa nepoškodila rohovka. Celistvosť rohovky sa rýchlo vyhodnotí kvapkou 2 % (m/V) fluoresceínu sodného, ktorá sa nanesie na povrch rohovky na niekoľko sekúnd a potom sa opláchne izotonickým fyziologickým roztokom. Oči ošetrené fluoresceínom sa potom prehliadnu pod biomikroskopom, aby sa potvrdilo, že rohovka je nepoškodená (t. j. hodnota zadržania fluoresceínu a zákalu rohovky ≤ 0,5).

19. Ak je rohovka nepoškodená, oko sa vyreže z lebky a dbá sa na to, aby sa nepoškodila rohovka. Očná guľa sa vytiahne z očnej jamky, pričom sa tretie viečko pevne zachytí chirurgickými kliešťami a očné svaly sa prestrihnú ohnutými nožnicami s tupými hrotmi. Dôležité je zabrániť poškodeniu rohovky nadmerným tlakom (napr. kompresnými predmetmi).

20. Keď sa oko vyberie z očnej jamky, mala by sa na ňom ponechať viditeľná časť očného nervu. Po vybratí z očnej jamky sa oko položí na absorpčnú podložku a odreže sa tretie viečko a iné spojovacie tkanivá.

▼M2

21. Vylúpnuté oko sa upevní do svorky z nehrdzavejúcej ocele tak, aby rohovka bola v kolmej polohe. Svorka sa potom prenesie do komory superfúzneho prístroja (16). Svorky by sa mali do superfúzneho prístroja vložiť tak, aby celá rohovka bola ponorená v izotonickom fyziologickom roztoku. Komory superfúzneho prístroja by mali mať riadenú teplotu 32 ± 1,5 °C. V dodatku 3 je uvedená schéma typického superfúzneho prístroja a očných svoriek, ktoré je možné kúpiť alebo zhotoviť. Prístroj sa môže upraviť tak, aby vyhovoval potrebám konkrétneho laboratória (napr. na uloženie rôzneho počtu očí).

22. Po vložení do superfúzneho prístroja sa oči znova prehliadnu pod biomikroskopom a skontroluje sa, či počas resekcie nedošlo k ich poškodeniu. Súčasne by sa mala odmerať aj hrúbka rohovky na vrchole rohovky s použitím meracieho zariadenia na biomikroskope. Oči s i) hodnotou zadržania fluoresceínu > 0,5; ii) hodnotou zákalu rohovky > 0,5 alebo iii) s akýmikoľvek inými znakmi poškodenia by sa mali nahradiť inými. Spomedzi očí, ktoré sa nevyradia na základe niektorého z týchto kritérií, sa musia vyradiť oči s hrúbkou rohovky, ktorá má odchýlku viac ako 10 % z priemernej hodnoty za všetky oči. Používatelia by mali vedieť, že biomikroskopy môžu poskytovať rôzne namerané údaje hrúbky rohovky, ak je nastavená rôzna šírka štrbiny. Šírka štrbiny by mala byť nastavená na 0,095 mm.

23. Keď sa všetky oči prezrú a sú vyhovujúce, inkubujú sa asi 45 až 60 minút, aby sa dostali do ustáleného stavu s testovacím systémom pred dávkovaním. Po dobe ustaľovania sa zaznamená nulové referenčné meranie na hrúbku a zákal rohovky, ktoré slúži ako základný stav (t. j. čas = 0). Hodnota fluoresceínu stanovená pri resekcii sa používa ako základné meranie tohto konečného výsledku.

Nanesenie testovanej látky

24. Hneď po nulových referenčných meraniach sa oko (v držiaku) vyberie zo superfúzneho prístroja, uloží sa do vodorovnej polohy a na rohovku sa nanesie testovaná látka.

25. Kvapalné testované látky sa zvyčajne testujú nezriedené, ale ak sa to považuje za potrebné, môžu sa zriediť (napr. ako súčasť návrhu štúdie). Ako rozpúšťadlo pre zriedené látky sa uprednostňuje fyziologický roztok. V riadených podmienkach sa však môžu používať aj iné rozpúšťadlá, ale mala by sa preukázať vhodnosť iných rozpúšťadiel použitých namiesto fyziologického roztoku.

26. Kvapalné testované látky sa nanesú na rohovku tak, aby celý povrch rohovky bol rovnomerne pokrytý testovanou látkou; štandardný objem je 0,03 ml.

27. Ak je to možné, tuhé látky by sa mali čo najjemnejšie rozdrviť tĺčikom v trecej miske alebo podobným drviacim nástrojom. Prášok sa potom nanesie na rohovku tak, aby povrch bol rovnomerne pokrytý testovanou látku; štandardné množstvo je 0,03 g.

28. Testovaná látka (kvapalná alebo tuhá) sa nanesie na 10 sekúnd a potom sa opláchne z oka izotonickým fyziologickým roztokom (približne 20 ml) pri teplote okolitého prostredia. Oko (v držiaku) sa následne vráti do superfúzneho prístroja do pôvodnej zvislej polohy.

Kontrolné látky

29. Súbežné negatívne kontroly alebo kontroly rozpúšťadla/nosiča a pozitívne kontroly by sa mali začleniť do každého pokusu.

▼M2

30. Keď sa testujú kvapaliny s koncentráciou 100 % alebo tuhé látky, v testovacej metóde izolovaného kuracieho oka sa používa fyziologický roztok ako súbežná negatívna kontrola na zisťovanie nešpecifických zmien v testovacom systéme a aby sa zabezpečilo, že podmienky rozboru nevyvolajú nežiaducu reakciu vo forme podráždenia.

31. Keď sa testujú nezriedené kvapaliny, súbežná skupina na kontrolu rozpúšťadla/nosiča sa začlení do testovacej metódy, aby sa zistili nešpecifické zmeny v testovacom systéme a aby sa zabezpečilo, že podmienky rozboru nevyvolajú nežiaducu reakciu vo forme podráždenia. Ako sa uvádza v odseku 25, môže sa použiť iba také rozpúšťadlo/nosič, o ktorom sa preukázalo, že nemá nepriaznivé účinky na testovací systém.

32. Do každého pokusu sa začlení známa očná dráždivá látka ako súbežná pozitívna kontrola, aby sa overilo, že sa vyvolala náležitá reakcia. Keďže v tejto testovacej metóde sa používa rozbor izolovaného kuracieho oka na zisťovanie žieravín alebo silne dráždivých látok, na pozitívnu kontrolu by sa mala použiť referenčná látka, ktorá pri tejto testovacej metóde vyvoláva silnú reakciu. Aby sa však umožnilo vyhodnotenie premenlivosti reakcie pri pozitívnej kontrole v čase, závažnosť dráždivej reakcie by nemala byť extrémne silná. Mali by sa vygenerovať dostatočné údaje *in vitro* na pozitívnu kontrolu, aby bolo možné vypočítať štatisticky vymedzený prijateľný rozsah pre pozitívnu kontrolu. Ak na určitú pozitívnu kontrolu nie sú k dispozícii primerané historické údaje testovacej metódy izolovaného kuracieho oka, môže byť potrebné vykonať štúdie, ktoré by tieto informácie poskytli.

33. Príkladom pozitívnych kontrol na kvapalné testované látky je 10 % kyselina octová alebo 5 % benzalkónium chlorid, zatiaľ čo príkladom pozitívnych kontrol na tuhé testované látky je hydroxid sodný alebo imidazol.

34. Referenčné látky sú užitočné na posudzovanie schopnosti neznámych chemikálií určitých chemických tried alebo tried výrobkov spôsobovať očné podráždenie alebo na posudzovanie pomerného dráždivého potenciálu očnej dráždivej látky v určitom rozsahu dráždivých reakcií.

Meranie konečných výsledkov

35. Merané rohovky sa posudzujú pred úpravou a 30, 75, 120, 180 a 240 minút (± 5 minút) po opláchnutí po testovanej látke. Tieto časové body poskytujú primeraný počet meraní počas 4 hodín ošetrenia, pričom medzi meraniami zostáva dostatok času na vykonanie predpísaných pozorovaní pre všetky oči.

36. Posudzované konečné výsledky sú zákal rohovky, zdurenie rohovky, zadržanie fluoresceínu v rohovke a morfologické účinky (napr. tvorba jamiek alebo uvoľnenie epitelu). Všetky konečné výsledky, s výnimkou zadržania fluoresceínu (ktoré sa stanovuje iba pred úpravou a 30 minút po vystavení pôsobeniu testovanej látky), sa stanovujú v každom z uvedených časových bodov.

37. Odporúča sa vyhotoviť fotografie na zdokumentovanie zákalu rohovky, zadržania fluoresceínu, morfologických účinkov a histopatológie, ak sa vykoná.

38. Po poslednom prehliadnutí po štyroch hodinách sa používateľom odporúča, aby oči uložili do vhodného fixačného roztoku (napr. neutrálneho tlmivého roztoku formalínu) pre prípadné histopatologické skúmanie.

▼M2

39. Zdurenie rohovky sa stanovuje meraním hrúbky rohovky optickým pachymetrom na biomikroskope. Vyjadruje sa v percentách a vypočíta sa z nameraných údajov hrúbky rohovky podľa tohto vzorca:

$$\left(\frac{\textit{hrëbka rohovky v čase } t \; - \; \textit{hrëbka rohovky v čase } = \; 0}{\textit{hrëbka rohovky rohovky čase } = \; 0} \right) \times 100$$

40. Priemerná percentuálna hodnota zdurenia rohovky za všetky testované oči sa vypočíta pre všetky časové body merania. Na základe najvyššej priemernej hodnoty zdurenia rohovky, nameranej v každom časovom bode, sa potom určí celková hodnota kategórie na každú testovanú látku.

41. Zákal rohovky sa vypočíta tak, že na hodnotenie sa použije časť rohovky, ktorá je najhustejšie zakalená. Priemerná hodnota zákalu rohovky za všetky testované oči sa vypočíta pre všetky časové body merania. Na základe najvyššej priemernej hodnoty zákalu rohovky, nameranej v každom časovom bode, sa potom určí celková hodnota kategórie pre každú testovanú látku (tabuľka 1).

Tabuľka 1

Hodnoty zákalu rohovky

Hodnota	Vyhodnotenie pozorovania
0	Bez zákalu
0,5	Veľmi slabý zákal
1	Roztrúsené alebo rozptýlené plochy; detaily dúhovky sú jasne viditeľné
2	Ľahko rozpoznateľná priehľadná plocha; detaily dúhovky sú mierne zatemnené
3	Silný zákal rohovky; žiadne špecifické detaily dúhovky nie sú viditeľné; veľkosť zrenice je sotva rozpoznateľná
4	Úplný zákal rohovky; dúhovka nie je viditeľná

42. Priemerná hodnota zadržania fluoresceínu za všetky testované oči sa vypočíta len na meranie v časovom bode 30 minút a použije sa na určenie celkovej hodnoty kategórie na každú testovanú látku (tabuľka 2).

Tabuľka 2

Hodnoty zadržania fluoresceínu

Hodnota	Vyhodnotenie pozorovania
0	Žiadne zadržanie fluoresceínu
0,5	Veľmi malá škvrna na jednej bunke
1	Škvrny na jednej bunke rozptýlené po celej ošetrenej ploche rohovky
2	Ložiská alebo splývajúce škvrny na jednej bunke
3	Splývajúce veľké plochy rohovky zadržiavajúce fluoresceín

▼M2

43. Medzi morfologické účinky patrí „jamkovanie“ buniek epitelu rohovky, „uvoľnenie“ epitelu, „zdrsnenie“ povrchu rohovky a „priľnutie“ testovanej látky k rohovke. Tieto zistenia môžu byť rôzne, pokiaľ ide o ich závažnosť, a môžu sa vyskytovať súčasne. Klasifikácia týchto zistení je subjektívna podľa výkladu výskumníka.

ÚDAJE A SPRÁVA

Vyhodnotenie údajov

44. Výsledné hodnoty zákalu rohovky, zdurenia rohovky a zadržania fluoresceínu by sa mali posudzovať osobitne, aby sa stanovila trieda izolovaného kuracieho oka pre každý konečný výsledok. Triedy izolovaného kuracieho oka pre každý konečný výsledok sa potom zlúčia a stanoví sa klasifikácia dráždivosti na každú testovanú látku.

Rozhodovacie kritériá

45. Keď sa posúdi každý konečný výsledok, môžu sa priradiť triedy izolovaného kuracieho oka na základe vopred určeného rozsahu. Výklad hrúbky rohovky (tabuľka 3), zákalu (tabuľka 4) a zadržania fluoresceínu (tabuľka 5) s použitím štyroch tried izolovaného kuracieho oka sa robí podľa týchto stupníc:

Tabuľka 3

Klasifikačné kritériá izolovaného kuracieho oka na hrúbku rohovky

Priemerné zdurenie rohovky (%) (*)	Trieda izolovaného kuracieho oka
0 až 5	I
> 5 až 12	II
> 12 až 18 (> 75 minút po ošetrení)	II
> 12 až 18 (≤ 75 minút po ošetrení)	III
> 18 až 26	III
> 26 až 32 (> 75 minút po ošetrení)	III
> 26 až 32 (≤ 75 minút po ošetrení)	IV
> 32	IV

(*) Tieto hodnoty zdurenia rohovky platia iba vtedy, ak sa hrúbka meria biomikroskopom Haag-Streit BP900 so zariadením na meranie hĺbky č. I a pri nastavení šírky štrbiny 9½, ktorá sa rovná 0,095 mm. Používatelia by mali vedieť, že biomikroskopy môžu dávať rôzne namerané hodnoty hrúbky rohovky, ak je nastavená rôzna šírka štrbiny.

Tabuľka 4

Klasifikačné kritériá izolovaného kuracieho oka na zákal

Priemerná hodnota pre maximálny zákal (*)	Trieda izolovaného kuracieho oka
0,0 – 0,5	I
0,6 – 1,5	II
1,6 – 2,5	III
2,6 – 4,0	IV

(*) Pozri tabuľku 1.

▼M2

Tabuľka 5

Klasifikačné kritériá izolovaného kuracieho oka na priemerné zadržanie fluoresceínu

Priemerná hodnota zadržania fluoresceínu 30 minút po ošetrení (*)	Trieda izolovaného kuracieho oka
0,0 – 0,5	I
0,6 – 1,5	II
1,6 – 2,5	III
2,6 – 3,0	IV

(*) Pozri tabuľku 2.

46. Celková klasifikácia dráždivosti *in vitro* na testovanú látku sa hodnotí pomocou klasifikácie dráždivosti, ktorá zodpovedá kombinácii kategórií získaných pre zdurenie rohovky, zákal rohovky a zadržanie fluoresceínu a použitím schémy uvedenej v tabuľke 6.

Tabuľka 6

Celková klasifikácia dráždivosti *in vitro*

Klasifikácia	Kombinácie 3 konečných výsledkov
Žieravina/silne dráždivá látka	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) Zákal rohovky ≥ 3 po 30 minútach (aspoň v 2 očiach) Zákal rohovky = 4 v ktoromkoľvek časovom bode (aspoň v 2 očiach) Závažné uvoľnenie epitelu (aspoň v 1 oku)

(*) Kombinácie, ktorých výskyt je menej pravdepodobný.

47. Ako sa uvádza v odseku 1, ak sa testovaná látka nepreukáže ako očná žieravina alebo silne dráždivá látka, malo by sa vykonať ďalšie testovanie na účely klasifikácie a označovania. Testovacia metóda izolovaného kuracieho oka má celkovú presnosť 83 % (120/144) až 87 % (134/154), mieru falošnej pozitivity 6 % (7/122) až 8 % (9/116) a mieru falošnej negativity 41 % (13/32) až 50 % (15/30) na zisťovanie očných žieravín a silne dráždivých látok v porovnaní s údajmi metódy na testovanie očí králikov *in vivo* klasifikovanej podľa klasifikačného systému EPA (1), EÚ (2) alebo GHS (3). Keď sa látky v rámci určitých chemických tried (t. j. alkoholy a povrchovo aktívne látky) a fyzikálnych tried (t. j. tuhé látky) vylúčia z databázy, presnosť testovania izolovaného kuracieho oka v klasifikačných systémoch EÚ, EPA a GHS je v rozsahu 91 % (75/82) až 92 % (69/75), miery falošnej pozitivity sú v rozsahu 5 % (4/73) až 6 % (4/70) a miery falošnej negativity sú v rozsahu 29 % (2/7) až 33 % (3/9) (4).

48. Aj keď sa nezíska klasifikácia očnej žieravosti alebo silnej dráždivosti testovanej látky, údaje testovania izolovaného kuracieho oka môžu byť užitočné v spojení s testovacími údajmi z testu očí králikov *in vivo* alebo z vhodne overeného testu *in vitro* na ďalšie posúdenie použiteľnosti a obmedzení testovacej metódy izolovaného kuracieho oka na zisťovanie slabo dráždivých a nedráždivých látok (usmernenie na používanie testovacích metód očnej toxicity *in vitro* je v štádiu vývoja).

▼M2

Kritériá prijateľnosti štúdie

49. Test sa považuje za prijateľný, ak výsledkom súbežných negatívnych kontrol a kontrol rozpúšťadla/nosiča a súbežných pozitívnych kontrol je klasifikácia dráždivosti, ktorá patrí do triedy nedráždivých látok, resp. silne dráždivých látok/žieravín.

Správa o testovaní

50. Správa o testovaní by mala obsahovať tieto informácie, ak sú dôležité na vykonanie štúdie:

Testované a kontrolné látky

Názov chemikálie (názvy chemikálií), ako je štrukturálny názov, ktorý používa služba Chemical Abstracts Service (ďalej len „CAS“), po ktorom nasledujú iné názvy, ak sú známe;

registračné číslo CAS, ak je známe;

čistota a zloženie látky alebo zmesi (v hmotnostných percentách), pokiaľ je táto informácia k dispozícii;

fyzikálno-chemické vlastnosti, ako je fyzikálny stav, prchavosť, pH, stabilita, chemická trieda, rozpustnosť vo vode dôležitá na vykonanie štúdie;

prípadná úprava testovaných/kontrolných látok pred testovaním (napr. zahrievanie, drvenie);

stabilita, ak je známa.

Informácie týkajúce sa objednávateľa a testovacieho zariadenia

Meno a adresa objednávateľa, testovacieho zariadenia a vedúceho štúdie;

identifikácia zdroja očí (t. j. zariadenie, v ktorom sa vykonal ich odber);

podmienky skladovania a dopravy očí (napr. dátum a čas odberu očí, časový interval pred začiatkom testovania);

osobitné charakteristiky zvierat, od ktorých sa vykonal odber očí (napr. vek, pohlavie, hmotnosť darcovského zvieraťa), ak sú k dispozícii.

Zdôvodnenie testovacej metódy a použitý protokol

Integrita testovacej metódy

Postup, ktorý sa používa na zabezpečenie integrity (t. j. presnosti a spoľahlivosti) testovacej metódy v čase (napr. pravidelné testovanie látok na preukázanie spôsobilosti, používanie historických negatívnych a pozitívnych kontrolných údajov).

Kritériá pre prijateľný test

Prijateľné rozsahy prípadných súbežných referenčných kontrol na základe historických údajov.

Podmienky testovania

Opis použitého testovacieho systému;

použitý typ biomikroskopu (napr. označenie modelu);

nastavenia použitého biomikroskopu;

informácie o použitých kuracích očiach, vrátane prehlásenia o ich kvalite;

▼M2

podrobnosti o použitom testovacom postupe;

koncentrácia (koncentrácie) použitej testovanej látky (látok);

opis všetkých úprav testovacieho postupu;

odkaz na historické údaje modelu (napr. negatívne a pozitívne kontroly, látky na preukázanie spôsobilosti, referenčné látky);

opis použitých hodnotiacich kritérií.

Výsledky

Opis iných pozorovaných účinkov;

prípadne fotografie oka.

Diskusia

Záver

LITERATÚRA

(1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual (Príručka na kontrolu označení): 2. vydanie. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency (Agentúra USA pre ochranu životného prostredia).

(2) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene a doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006. Ú. v. EÚ L 353, 31.12.2008, s. 1.

(3) Organizácia Spojených národov (OSN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) [Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemikálií (ďalej len „GHS“)]. Druhé prepracované vydanie, OSN New York a Ženeva, 2007. Dostupné na:

[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html]

(4) ICCVAM (2007). Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives (Správa o hodnotení testovacích metód –testovacie metódy očnej toxicity *in vitro* na zisťovanie očných silne dráždivých a žieravých látok). Medziagentúrny koordinačný výbor pre overovanie alternatívnych metód a národný toxikologický program (ďalej len „NTP“) medziagentúrneho strediska pre overovanie alternatívnych toxikologických metód (ďalej len „NICEATM“). Publikácia NIH č.: 07-4517. Dostupné na:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(5) ESAC (2007). Statement on the conclusion of the ICCVAM retrospective study on organotypic *in vitro* assays as screening tests to identify potential ocular corrosives and severe eye irritants (Oznámenie o závere retrospektívnej štúdie ICCVAM o organotypických rozboroch *in vitro* ako kontrolných testoch na zisťovanie potenciálnych očných žieravín a silne dráždivých látok). Dostupné na:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm]

(6) Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 z 18. decembra 2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemikálií (REACH) a o zriadení Európskej chemickej agentúry, o zmene a doplnení smernice 1999/45/ES a o zrušení nariadenia Rady (EHS) č. 793/93 a nariadenia Komisie (ES) č. 1488/94, smernice Rady 76/769/EHS a smerníc Komisie 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES. Ú. v. EÚ L 396, 30.12.2006, s. 1.

(7) OECD (2002). Test Guideline 405 (Usmernenie na testovanie 405). OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion (Usmernenie OECD na testovanie chemikálií. Akútne podráždenie očí/žieravosť). Dostupné na:

[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]

▼**M2**

(8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol (Protokol testovacej metódy zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky odporúčaný výborom ICCVAM). In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives (V: Správa ICCVAM o hodnotení testovacej metódy – testovacie metódy očnej toxicity *in vitro* na zisťovanie očných silne dráždivých látok a žieravín). Medziagentúrny koordinačný výbor pre overovanie alternatívnych metód a národný toxikologický program medziagentúrneho strediska na overovanie alternatívnych toxikologických metód. Publikácia NIH č.: 07-4517. Dostupné na:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm]

(9) ICCVAM. (2006). Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye Test Method (Súčasný stav testovacích metód *in vitro* na zisťovanie očných žieravín a silne dráždivých látok: testovacia metóda izolovaného kuracieho oka). Publikácia NIH č.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Dostupné na:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]

(10) Prinsen, M.K. a Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits (Dôvody na testovanie vylúpnutých očí na očiach jatočných zvierat ako alternatívy k Draize testu dráždivosti na králikoch). *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.

(11) INVITTOX (1994). Chicken enucleated eye test (CEET). (Protokol 80: Testovanie vylúpnutých kuracích očí). Dostupné na:

[http://ecvam.jrc.it/index.htm].

(12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. a Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test (Medzinárodná hodnotiaca štúdia ES/humanitárnych organizácií o alternatívach k Draize testu očnej dráždivosti). *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.

(13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials [Testovanie vylúpnutých kuracích očí: praktická (predbežná) kontrola na hodnotenie schopnosti testovaných materiálov vyvolať očné podráždenie/žieravý účinok]. *Food Chem. Toxicol*. 34:291 – 296.

(14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. a Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation (Organotypické modely na hodnotenie/predvídanie očného podráždenia). *Food Chem. Toxicol.* 35:23 – 37.

(15) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., a the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (Poradný výbor pre postupy na kontrolu nákaz v zdravotnej starostlivosti) (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings (Usmernenie pre izolačné opatrenia: predchádzanie prenosu pôvodcov nákaz v organizáciách zdravotnej starostlivosti). Dostupné na:

[http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf].

(16) Maurer, J.K., Parker, R.D. a Jester J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays (Rozsah poranení rohovky ako mechanický základ podráždenia očí: hlavné zistenia a odporúčania na vývoj alternatívnych rozborov). *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106 – 117.

(17) Burton, A.B.G., M. York a R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants (Hodnotenie silne dráždivých látok *in vitro)*. *Fd. Cosmet.- Toxicol.*- 19, 471 – 480.

▼**M2**

(18) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of In Vitro Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) Test Method (Informačný dokument o kontrole, aktuálny stav testovacích metód *in vitro* na zisťovanie očných žieravín a silne dráždivých látok: testovacia metóda zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky). Dostupné na:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].

(19) ICCVAM (2006). Background review document, Current Status of *In Vitro* Test Methods for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants: Isolated Chicken Eye (ICE) Test Method (Informačný dokument o kontrole, aktuálny stav testovacích metód *in vitro* na zisťovanie očných žieravín a silne dráždivých látok: testovacia metóda izolovaného kuracieho oka). Dostupné na:

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm].

▼M2

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: blízkosť zhody výsledkov testovacej metódy s prijatými referenčnými hodnotami. Je to miera výkonnosti testovacej metódy a jeden z aspektov „významnosti“. Tento pojem sa často používa ako zameniteľný s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy.

Referenčná látka: látka, ktorá sa používa ako štandard na porovnávanie s testovanou látkou. Referenčná látka by mala mať tieto vlastnosti: i) stály a spoľahlivý zdroj (zdroje); ii) štrukturálnu a funkčnú podobnosť s triedou látok, ktoré sa testujú; iii) známe fyzikálne/chemické vlastnosti; iv) podporné informácie o známych účinkoch a v) známu účinnosť v rozsahu žiadanej reakcie.

Rohovka: priehľadná časť prednej strany očnej gule, ktorá pokrýva dúhovku a zrenicu a prepúšťa svetlo do vnútra oka.

Zákal rohovky: miera rozsahu zakalenia rohovky po vystavení pôsobeniu testovanej látky. Zvýšený zákal rohovky je príznakom poškodenia rohovky.

Zdurenie rohovky: pri testovaní izolovaného kuracieho oka objektívne meranie rozsahu roztiahnutia rohovky po vystavení pôsobeniu testovanej látky. Vyjadruje sa v percentách a vypočíta sa zo základných (pred dávkovaním) meraní hrúbky rohovky a hrúbky zaznamenanej po vystavení pôsobeniu testovaného materiálu pri testovaní izolovaného kuracieho oka. Miera zdurenia rohovky je príznakom poškodenia rohovky.

EPA kategória 1: žieravé (nevratné zničenie očného tkaniva) alebo postihnutie rohovky alebo podráždenie, ktoré pretrváva viac ako 21 dní (1).

EÚ kategória R41: vznik poškodenia tkaniva v oku alebo závažné fyzické zhoršenie videnia po nanesení testovanej látky na predný povrch oka, ktoré nie je úplne vratné do 21 dní od nanesenia (2).

Miera falošnej negativity: podiel všetkých pozitívnych látok, ktoré sú testovacou metódou nesprávne identifikované ako negatívne. Je to jeden z ukazovateľov výkonnosti testovacej metódy.

Miera falošnej pozitivity: podiel všetkých negatívnych látok, ktoré sú testovacou metódou nesprávne identifikované ako pozitívne. Je jedným z ukazovateľov výkonnosti testovacej metódy.

Zadržanie fluoresceínu: pri testovaní izolovaného kuracieho oka subjektívne meranie množstva fluoresceínu sodného, ktorý zadržia epiteliálne bunky v rohovke po vystavení pôsobeniu testovanej látky. Miera zadržania fluoresceínu je príznakom poškodenia epitelu rohovky.

GHS (globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemických látok): systém navrhovania klasifikácie chemikálií (látok a zmesí) podľa štandardizovaných typov a stupňov fyzických, zdravotných a environmentálnych nebezpečenstiev a označovania pomocou príslušných komunikačných prvkov, ako sú piktogramy, signalizačné slová, upozornenia na nebezpečenstvo, bezpečnostné upozornenia a karty bezpečnostných údajov na sprostredkovanie informácií o ich nepriaznivých účinkoch s cieľom chrániť ľudí (vrátane zamestnancov, pracujúcich, dopravcov, spotrebiteľov a subjekty zodpovedné za riešenie núdzových situácií) a životné prostredie (3).

▼M2

GHS kategória 1: vznik poškodenia tkaniva v oku alebo závažné fyzické zhoršenie videnia po nanesení testovanej látky na predný povrch oka, ktoré nie je úplne vratné do 21 dní po nanesení (3).

Nebezpečenstvo: vnútorná vlastnosť činidla alebo situácia, ktorá má schopnosť vyvolať nepriaznivé účinky pri vystavení organizmu, systému alebo obyvateľstva (skupiny obyvateľov) pôsobeniu tohto činidla.

Negatívna kontrola: neupravená replika, ktorá obsahuje všetky zložky testovacieho systému. Táto vzorka sa spracuje so vzorkami upravenými testovanou látkou a s inými kontrolnými vzorkami s cieľom zistiť, či rozpúšťadlo a testovací systém na seba navzájom pôsobia.

Nedráždivá látka: látka, ktorá v EPA kategórii I, II ani III; v EÚ kategórii R41 ani R36, ani v GHS kategórii 1, 2A ani 2B nie je klasifikovaná ako očná dráždivá látka (1) (2) (3).

Očná žieravina: a) látka, ktorá spôsobuje nevratné poškodenie tkaniva oka; b) látka, ktorá je v GHS kategórii 1, v EPA kategórii I alebo v EÚ kategórii R41 klasifikovaná ako očná žieravina (1) (2) (3).

Očná dráždivá látka: a) látka, ktorá vyvoláva nevratnú zmenu v oku po nanesení na predný povrch oka; b) látka, ktorá je v EPA kategórii II alebo III, v EÚ kategórii R36 alebo v GHS kategórii 2A alebo 2B klasifikovaná ako očná dráždivá látka (1) (2) (3).

Očná silne dráždivá látka: a) látka, ktorá po nanesení na predný povrch oka vyvoláva poškodenie očného tkaniva, ktoré neustúpi do 21 dní po nanesení, alebo spôsobuje závažné fyzické zhoršenie videnia; b) látka, ktorá je v GHS kategórii 1, v EPA kategórii I alebo v EÚ kategórii R41 klasifikovaná ako očná dráždivá látka (1) (2) (3).

Pozitívna kontrola: replika obsahujúca všetky zložky testovacieho systému a upravená látkou, o ktorej sa vie, že vyvoláva pozitívnu reakciu. S cieľom zabezpečiť možnosť vyhodnotiť premenlivosť reakcie pri pozitívnej kontrole v čase by však závažnosť reakcie nemala byť extrémne silná.

Spoľahlivosť: miera rozsahu, v ktorom sa testovacia metóda môže opakovane vykonávať v čase v laboratóriu a medzi laboratóriami, pričom sa používa rovnaký protokol. Hodnotí sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti a vnútrolaboratórnej opakovateľnosti.

Biomikroskop: prístroj používaný na priame preskúmanie oka pri zväčšení binokulárnym mikroskopom s vytvorením stereoskopického vzpriameného obrazu. V testovacej metóde izolovaného kuracieho oka sa tento prístroj používa na prehliadanie predných štruktúr kuracieho oka, ako aj na objektívne meranie hrúbky rohovky pomocou pripojeného zariadenia na meranie hĺbky.

Kontrola rozpúšťadla/nosiča: neupravená vzorka, ktorá obsahuje všetky zložky testovacieho systému, vrátane rozpúšťadla alebo nosiča, ktorá sa spracuje so vzorkami upravenými testovanou látkou a s inými kontrolnými vzorkami, a zistí sa základná reakcia vzoriek upravených testovanou látkou rozpustenou v tom istom rozpúšťadle alebo nosiči. Keď sa táto vzorka testuje so súbežnou negatívnou kontrolou, preukazuje sa aj to, či rozpúšťadlo, alebo nosič a testovací systém na seba navzájom pôsobia.

▼M2

Postupné testovanie: stratégia postupného testovania, pri ktorej sa všetky existujúce informácie o testovanej látke kontrolujú v určitom poradí, s použitím postupu posudzovania závažnosti dôkazov v každom stupni a zisťuje sa, či je k dispozícii dostatok informácií na rozhodnutie o klasifikácii nebezpečenstva pred postupom do ďalšieho stupňa. Ak sa dráždivý potenciál testovanej látky môže stanoviť na základe existujúcich informácií, nevyžaduje sa žiadne ďalšie testovanie. Ak dráždivý potenciál testovanej látky nemožno stanoviť na základe existujúcich informácií, vykonáva sa testovanie metódou postupných krokov na zvieratách, až kým sa nedá urobiť jednoznačná klasifikácia.

Overená testovacia metóda: testovacia metóda, pre ktorú sa ukončili hodnotiace štúdie a zistila sa významnosť (vrátane presnosti) a spoľahlivosť na určitý účel. Je dôležité poznamenať, že overená testovacia metóda nemusí mať dostatočnú výkonnosť z hľadiska presnosti a spoľahlivosti, aby sa mohla považovať za prijateľnú na navrhnutý účel.

Posudzovanie závažnosti dôkazov: postup posudzovania silných a slabých stránok rôznych informácií na dosiahnutie a podporu záveru, ktorý sa týka potenciálu nebezpečnosti nejakej látky.

▼M2

Dodatok 2

LÁTKY NA PREUKAZOVANIE SPÔSOBILOSTI PRE TESTOVACIU METÓDU IZOLOVANÉHO KURACIEHO OKA

Pred rutinným používaním testovacej metódy, ktorá zodpovedá tejto testovacej metóde, môžu laboratóriá preukázať svoju technickú spôsobilosť správnym stanovením klasifikácie očnej žieravosti 10 látok odporúčaných v tabuľke 1. Výber týchto látok sa vykonal tak, aby zastupovali ten rozsah reakcií lokálneho podráždenia oka/žieravého účinku na oko, ktorý vychádza z výsledkom testov očí králikov *in vivo* (TG 405) (t. j. kategórie 1, 2A, 2B alebo látky neklasifikované alebo označené podľa GHS OSN) (3) (7). Vzhľadom na overenú použiteľnosť týchto rozborov (t. j. iba na zisťovanie očných žieravín/silne dráždivých látok) tu však existujú len dva výsledky testov na účely klasifikácie (žieravina/silne dráždivá látka alebo nežieravina/slabo dráždivá látka) na preukázanie spôsobilosti. Ďalším kritériom na výber bola komerčná dostupnosť látok, dostupnosť vysoko kvalitných referenčných údajov *in vivo* a existencia vysoko kvalitných údajov z dvoch metód *in vitro*, pre ktoré sa pripravujú usmernenia na testovanie. Z toho dôvodu sa dráždivé látky vybrali zo zoznamu 122 referenčných látok, ktoré odporučil výbor ICCVAM na overovanie testovacích metód očnej toxicity *in vitro* (pozri dodatok H: Zoznam referenčných látok odporúčaných ICCVAM) (4). Referenčné údaje sú dostupné v podkladových kontrolných dokumentoch ICCVAM pre testovaciu metódu zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky a testovaciu metódu izolovaného kuracieho oka (18) (19).

Tabuľka 1

Odporúčané látky na preukazovanie technickej spôsobilosti na testovanie izolovaného kuracieho oka

Chemikália	CASRN	Chemická trieda (1)	Fyzikálna forma	Klasifikácia (2) *in vivo*	Klasifikácia (3) *in vitro*
Benzalkónium chlorid (5 %)	8001-54-5	Óniová zlúčenina	Kvapalina	Kategória 1	Žieravá/silne dráždivá látka
Chlórhexidín	55-56-1	Amín, amidín	Tuhá látka	Kategória 1	Žieravá/silne dráždivá látka
Kyselina dibenzoyl-L-vinná	2743-38-6	Karboxylová kyselina, ester	Tuhá látka	Kategória 1	Žieravá/silne dráždivá látka
Imidazol	288-32-4	Heterocyklická zlúčenina	Tuhá látka	Kategória 1	Žieravá/silne dráždivá látka
Kyselina trichlóroctová (30 %)	76-03-9	Karboxylová kyselina	Kvapalina	Kategória 1	Žieravá/silne dráždivá látka
2,6-dichlórbenzoyl chlorid	4659-45-4	Acylhalogenid	Kvapalina	Kategória 2A	Nežieravá/slabo dráždivá látka
Etyl-2-metylacetooctan	609-14-3	Ketón, ester	Kvapalina	Kategória 2B	Nežieravá/slabo dráždivá látka
Dusičnan amónny	6484-52-2	Anorganická soľ	Tuhá látka	Kategória 2A	Nežieravá/slabo dráždivá látka

▼**M2**

Chemikália	CASRN	Chemická trieda (1)	Fyzikálna forma	Klasifikácia (2) *in vivo*	Klasifikácia (3) *in vitro*
Glycerol	56-81-5	Alkohol	Kvapalina	Neoznačená	Nežieravá/slabo dráždivá látka
n-hexán	110-54-3	Uhľovodík (acyklický)	Kvapalina	Neoznačená	Nežieravá/slabo dráždivá látka

Skratky: CASRN = Registračné číslo Chemical Abstracts Service

(1) Chemické triedy sa stanovili na každú testovanú látku s použitím štandardnej klasifikačnej schémy na základe klasifikačného systému National Library of Medicine Medical Subject Headings (dostupné na http//www.nlm.nih.gov/mesh).

(2) Na základe výsledkov testu očí králikov *in vivo* (OECD TG 405) a s použitím GHS OSN (3)(7).

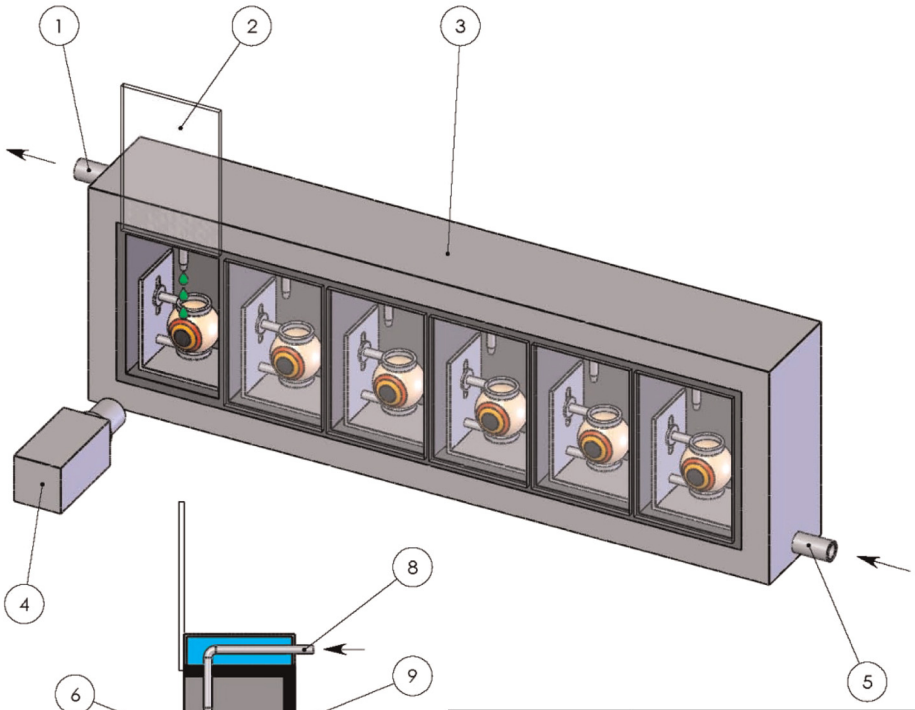
(3) Na základe výsledkov testovania zákalu a priepustnosti hovädzej rohovky a izolovaného kuracieho oka.

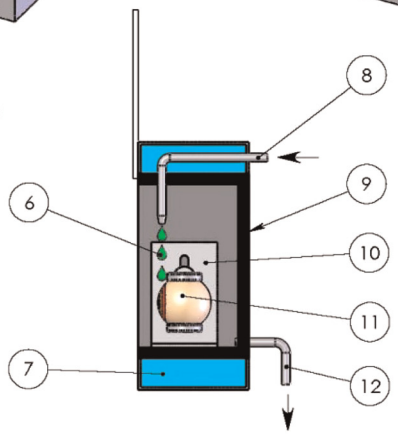
▼M2

Dodatok 3

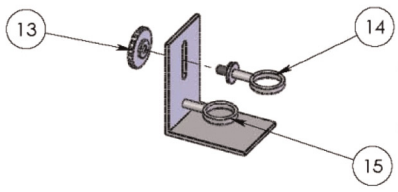
Schémy superfúzneho prístroja na oči a očných svoriek

[Ďalší generický všeobecný opis superfúzneho prístroja a očnej svorky pozri v publikácii Burton et al. (17)]





PRIEREZ PRIEHRADKY



DRŽIAK OKA

Č. POLOŽKY	OPIS
1	VYPÚŠŤACÍ OTVOR TEPLEJ VODY
2	POSUVNÉ DVIERKA
3	SUPERFÚZNY PRÍSTROJ
4	OPTICKÉ MERACIE ZARIADENIE
5	PLNIACI OTVOR TEPLEJ VODY
6	FYZIOLOGICKÝ ROZTOK
7	TEPLÁ VODA
8	PLNIACI OTVOR FYZIOLOGICKÉHO ROZTOKU
9	PRIEHRADKA
10	DRŽIAK OKA
11	KURACIE OKO
12	VYPÚŠŤACÍ OTVOR FYZIOLOGICKÉHO ROZTOKU
13	NASTAVOVACIA SKRUTKA
14	NASTAVITEĽNÉ HORNÉ RAMENO
15	PEVNÉ DOLNÉ RAMENO

▼M3

B.49. *IN VITRO* TEST MIKROJADIER BUNIEK CICAVCOV

ÚVOD

1. *In vitro* skúška mikrojadier (MNvit) je genotoxický test, ktorého cieľom je zistiť prítomnosť mikrojadier (MN) v cytoplazme buniek v interfáze. Mikrojadrá môžu pochádzať z acentrických fragmentov chromozómov (t. j. bez centroméry) alebo z celých chromozómov, ktoré počas anafázy delenia bunky nie sú schopné migrovať k pólom. Skúška zisťuje aktivitu klastogénnych a aneugénnych chemikálií (látok a zmesí) (1) (2) v bunkách, ktoré prešli bunkovým delením počas expozície testovanej látke alebo po nej. Táto testovacia metóda (TM) umožňuje využívať protokoly s inhibítorom polymerizácie aktínu, ktorý sa nazýva cytochalasín B (cytoB), a bez neho. Pridanie cytoB pred cieľovou mitózou umožňuje identifikovať a selektívne analyzovať frekvenciu mikrojadier v bunkách, ktoré ukončili jednu mitózu, keďže tieto bunky sú dvojjadrové (3) (4). Táto testovacia metóda tiež umožňuje využiť protokoly bez blokovania cytokinézy, ak existuje dôkaz, že populácia analyzovaných buniek prešla mitózou.

2. Okrem použitia skúšky MNvit na identifikáciu chemikálií (látok a zmesí), ktoré indukujú mikrojadrá, môže použitie inhibítorov cytokinézy, imunochemického označovania kinetochorov alebo hybridizácia s centromérovými/telomérovými sondami [fluorescenčná hybridizácia *in situ* (FISH)] tiež poskytnúť informácie o mechanizmoch poškodenia chromozómov a tvorbe mikrojadier (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16). Postupy označovania a hybridizácie možno použiť, ak dôjde k zvýšenej miere tvorby mikrojadier a výskumník chce určiť, či je tento nárast výsledkom klastogénnych a/alebo aneugénnych procesov.

3. Mikrojadrá predstavujú poškodenie, ktoré sa prenáša na dcérske bunky, zatiaľ čo chromozómové odchýlky zaznamenané v bunkách v metafáze nemožno preniesť. Keďže mikrojadrá v bunkách v interfáze možno hodnotiť relatívne objektívne, pracovníci laboratória musia určiť len to, či bunky prešli, alebo neprešli delením a koľko buniek obsahuje mikrojadro. Následne možno preparáty pomerne rýchlo vyhodnotiť a analýzu možno vykonať automaticky. Takto sa počas jedného ošetrenia môžu vyhodnotiť prakticky tisíce, a nielen stovky buniek, čím sa zvyšuje účinnosť skúšky. Nakoniec keďže mikrojadrá môžu vzniknúť v dôsledku spomalenia vzniku chromozómov, existuje možnosť zistiť činitele indukujúce aneuploidy, ktoré je zložité skúmať pomocou bežných testov chromozómových odchýlok, napr. usmernenie OECD o vykonávaní testov 473 (kapitola B.10 tejto prílohy) (17). Skúška MNvit však neumožňuje rozlišovať chemikálie indukujúce vznik polyploidov od tých chemikálií, ktoré indukujú klastogenicitu bez použitia špeciálnych postupov, ako napríklad fluorescenčnej hybridizácie *in situ* (FISH) opísanej v odseku 2.

4. Skúška MNvit je metóda *in vitro*, ktorá bežne využíva kultivované ľudské bunky alebo bunky hlodavcov. Poskytuje komplexný základ skúmania potenciálu poškodenia chromozómov *in vitro*, keďže možno zistiť aneugény, ako aj klastogény.

5. Skúška MNvit je spoľahlivá a účinná v prípade rôznych druhov buniek, a to s použitím alebo bez použitia cytoB. Platnosť skúšky MNvit podporuje množstvo údajov získaných z rôznych bunkových línií hlodavcov (CHO, V79, CHL/IU, a L5178Y) a ľudských lymfocytov (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31). Tieto údaje zahŕňajú najmä medzinárodné validačné štúdie, ktoré koordinovalo združenie Société Française de Toxicologie Génétique (SFTG) (18) (19) (20) (21) (22), a správy z medzinárodného seminára o testovaní

▼M3

genotoxicity (International Workshop on Genotoxicity Testing) (4) (16). Dostupné údaje boli opätovne prehodnotené vzhľadom na závažnosť dôkazov retrospektívnej validačnej štúdie, ktorú uskutočnilo Európske centrum pre validáciu alternatívnych metód (ECVAM) Európskej komisie, pričom táto testovacia metóda bola Vedeckým poradným výborom ECVAM (ESAC) schválená ako vedecky platná (32) (33) (34). Použitie ľudskej lymfoblastoidnej bunkovej línie TK6 (35), buniek HepG2 (36) (37) a primárnych embryonálnych buniek škrečka sýrskeho (38) bolo síce opísané, neboli však použité vo validačných štúdiách.

VYMEDZENIE POJMOV

6. Použité definície sú uvedené v dodatku 1.

ÚVODNÉ ÚVAHY

7. Testy, ktoré sa vykonávajú *in vitro*, si zvyčajne vyžadujú použitie exogénneho zdroja metabolickej aktivácie okrem prípadov, keď sú bunky v súvislosti s testovanými látkami metabolicky spôsobilé. Exogénny systém metabolickej aktivácie napodobňuje v plnej miere podmienky *in vivo*. Rovnako je potrebné predchádzať podmienkam, ktoré by viedli k falošným pozitívnym výsledkom, ktoré neodrážajú vnútornú mutagenitu a môžu vzniknúť v dôsledku takých faktorov, ako napríklad výrazné zmeny v hodnotách pH alebo osmolality alebo z dôvodu vysokej úrovne cytotoxicity (39) (40) (41). Ak testovaná chemikália spôsobí zmenu v hodnote pH média v čase pridania, je potrebné pH upraviť tlmením zásobného roztoku tak, aby všetky objemy pri všetkých testovacích koncentráciách a pri všetkých kontrolách ostali rovnaké.

8. Pri analýze indukcie mikrojadier je dôležité, aby mitóza prebehla v ošetrených aj v neošetrených kultúrach. Najinformatívnejšie štádium pre hodnotenie mikrojadier je v bunkách, ktoré ukončili jednu mitózu počas ošetrenia testovanou látky alebo po ošetrení.

PRINCÍP TESTU

9. Bunkové kultúry ľudského pôvodu alebo pochádzajúce z cicavcov sú vystavené testovanej látke s exogénnym zdrojom metabolickej aktivácie aj bez neho okrem prípadu, ak sú použité bunky s dostatočnou schopnosťou metabolizácie. Súčasťou každého testu sú chemikálie na súbežné kontroly s rozpúšťadlom/nosičom (VC) a chemikálie na pozitívnu kontrolu (PC).

10. Počas expozície testovanej látke alebo po expozícii sa bunky pestujú dostatočne dlho na to, aby sa umožnilo, že poškodenie chromozómov alebo deliaceho vretienka povedie k vytvoreniu mikrojadier v bunkách v interfáze. Na indukciu aneuploídie je zvyčajne potrebné, aby bola testovaná látka prítomná počas mitózy. Získané a zafarbené bunky v interfáze sa analyzujú na prítomnosť mikrojadier. V ideálnom prípade by sa mali mikrojadrá hodnotiť len v tých bunkách, ktoré počas expozície testovanej látke alebo v čase po expozícii ukončili mitózu. Ak boli kultúry ošetrené blokátorom cytokinézy, rovnaký výsledok sa dosiahne hodnotením len dvojjadrových buniek. Ak sa blokátor cytokinézy nepoužije, je dôležité preukázať, že analyzované bunky pravdepodobne prešli delením počas expozície testovanej látke alebo po nej. Pri všetkých protokoloch je dôležité preukázať, že došlo k proliferácii buniek v kontrolných, ako aj v ošetrených kultúrach, a rozsah cytotoxicity alebo cytostázy, ktorú vyvolala testovaná látka, je potrebné posúdiť v rámci kultúr (alebo v súbežných kultúrach), ktoré sa hodnotia z hľadiska mikrojadier.

▼M3

OPIS SKÚŠKY

Prípravy

11. Môžu sa použiť kultivované primárne ľudské periférne krvné lymfocyty (5) (19) (42) (43) a rôzne bunkové línie hlodavcov, ako napríklad bunky CHO, V79, CHL/IU a L5178Y (18) (19) (20) (21) (22) (25) (26) (27) (28) (30). Použitie iných bunkových línií a typov je potrebné zdôvodniť na základe ich preukázanej výkonnosti v skúške, ako sa uvádza v oddiele Kritériá prijateľnosti. Keďže pozaďová frekvencia mikrojadier ovplyvní citlivosť skúšky, odporúča sa použiť druhy buniek, ktoré majú nízku, stabilnú pozaďovú frekvenciu tvorby mikrojadier.

12. Ľudské periférne krvné lymfocyty je potrebné získať od mladých (od 18 do 35 rokov) zdravých nefajčiarov, ktorí v poslednom čase neboli vystavení genotoxickým chemikáliám alebo radiácii. Ak sa pre jedno použitie spoja bunky od viacerých darcov, mal by sa uviesť ich počet. Frekvencia mikrojadier sa s vekom zvyšuje, pričom tento trend je viac viditeľný u žien než u mužov (44) a treba to zohľadniť pri výbere darcovských buniek na spájanie.

Médiá a podmienky kultivácie

13. Na udržiavanie kultúr sú potrebné vhodné kultivačné médiá a inkubačné podmienky (kultivačné nádoby, koncentrácia CO_2, teplota a vlhkosť). Získané bunkové línie a kmene by sa mali pravidelne kontrolovať, pokiaľ ide o stabilitu modálneho počtu chromozómov a o to, či nedošlo ku kontaminácii mykoplazmou. V prípade kontaminácie alebo zmeny modálneho počtu chromozómov by sa nemali používať. Mal by byť známy čas bežného bunkového cyklu pre podmienky použitých kultúr v testovacom laboratóriu. Ak sa použije metóda blokovania cytokinézy, je potrebné optimalizovať koncentráciu inhibítora cytokinézy vzhľadom na príslušný druh bunky a mala by vykazovať tvorbu dostatočného počtu dvojjadrových buniek na hodnotenie.

Príprava kultúr

14. Zistené bunkové línie a kmene: bunky sa odoberú z uskladnených kultúr, zapustia sa do kultivačného média v takej hustote, pri ktorej kultúry nedosiahnu zhluk v monovrstvách, a suspenzné kultúry nedosiahnu nadmernú hustotu pred časom zberu a inkubujú sa pri teplote 37 °C.

15. Lymfocyty: celá krv ošetrená antikoagulantom (napr. heparínom) alebo oddelené lymfocyty sa pred expozíciou testovanej látke a cytoB kultivujú v prítomnosti mitogénu (napr. fytohemaglutinínu).

Metabolická aktivácia

16. Ak sa použijú bunky s nedostatočnou endogénnou metabolickou kapacitou, je potrebné použiť exogénny systém metabolickej aktivácie. Najpoužívanejším systémom je postmitochondriálna frakcia podporená spolufaktorom (S9), pripravená z pečene hlodavcov ošetrených činidlami na indukciu enzýmov, ako je napríklad Aroclor 1254 (45) (46) alebo zmes fenobarbitonu a β-naftoflavónu (46) (47) (48) (49). Druhá kombinácia nie je v rozpore so Štokholmským dohovorom o perzistentných organických látkach (50) ani nariadením (ES) č. 850/2004 o perzistentných organických znečisťujúcich látkach (66), pričom sa pri indukovaní oxidáz so zmiešanými funkciami preukázala ako rovnako účinná ako Aroclor 1254 (46) (47) (48) (49). Frakcia S9 sa v konečnom testovacom médiu zvyčajne používa v koncentráciách v rozpätí od 1 % – 10 % (objemové percentá). Stav systému metabolickej aktivácie môže závisieť od triedy testovanej chemikálie. V niektorých prípadoch môže byť vhodné využiť viac než jednu koncentráciu S9.

▼M3

17. Geneticky získané bunkové línie vyjadrujúce špecifické ľudské aktivačné enzýmy alebo aktivačné enzýmy hlodavcov môžu znížiť potrebu exogénneho systému metabolickej aktivácie a možno ich použiť ako testovacie bunky. V takýchto prípadoch by mal byť výber použitých bunkových línií vedecky podložený, napr. relevantnosťou oxidáz so zmiešanými funkciami pre metabolizmus testovanej látky (51) a ich schopnosťou odozvy na známe klastogény a aneugény (pozri samostatný oddiel Kritériá prijateľnosti). Je potrebné uviesť, že testovanú látku nemusí(-ia) nevyhnutne metabolizovať vyjadrená(-é) oxidáza(-y) so zmiešanými funkciami. V tomto prípade by negatívne výsledky nesvedčili o tom, že testovaná látka nie je schopná indukovať mikrojadrá.

Príprava testovanej látky

18. Chemikálie v tuhom skupenstve by sa pred ošetrením buniek mali rozpustiť v príslušných rozpúšťadlách alebo nosičoch a v prípade potreby rozriediť. Kvapalné chemikálie sa pred ošetrením môžu pridať priamo do testovacích systémov a/alebo rozriediť. Plyny alebo prchavé chemikálie by sa mali testovať pomocou vhodných úprav štandardných protokolov, ako napríklad ošetrenie v uzavretých nádobách (52) (53). Používajú sa čerstvé preparáty testovanej látky okrem prípadu, keď údaje o stabilite preukazujú prijateľnosť uskladnenia.

Podmienky testu

Rozpúšťadlá/nosiče

19. Rozpúšťadlo/nosič by nemal reagovať s testovanou látkou a nemal by byť ani nekompatibilný s prežitím buniek alebo so zachovaním aktivity S9 pri použitej koncentrácii. Ak sa používajú iné ako riadne zaužívané rozpúšťadlá/nosiče (napríklad voda, bunkové kultivačné médium, dimetylsulfoxid), ich použitie by malo byť podložené údajmi označujúcimi ich kompatibilitu s testovanou látkou a absenciu genetickej toxicity. Odporúča sa, aby sa vždy, keď je to možné, najskôr zvážilo použitie vodného rozpúšťadla/nosiča.

Použitie cytoB ako blokátora cytokinézy

20. Jedným z najdôležitejších faktorov pri skúške MNvit je zaistenie toho, aby hodnotené bunky prešli mitózou počas ošetrenia alebo v inkubačnej dobe po ošetrení, ak sa použije. CytoB je najbežnejšie používané činidlo na blokovanie cytokinézy, pretože tlmí vytváranie aktínu, a tým zabraňuje rozdeľovaniu dcérskych buniek po mitóze, čo vedie k vytváraniu dvojjadrových buniek (5) (54) (55). Hodnotenie mikrojadier preto možno obmedziť len na tie bunky, ktoré prešli mitózou počas ošetrenia alebo po ňom. Zároveň je možné merať účinok testovanej látky na kinetiku proliferácie buniek. CytoB sa používa na blokovanie cytokinézy pri použití ľudských lymfocytov, pretože v rámci kultúr, ako aj medzi rôznymi darcami sú dĺžky bunkových cyklov nepravidelné a nie všetky lymfocyty reagujú na PHA. Pri testovaní bunkových línií s cieľom stanoviť, či sa hodnotené bunky delili, boli použité iné metódy, ktoré sú uvedené nižšie (pozri odsek 26).

21. Vhodnú koncentráciu cytoB pre každý druh buniek by malo stanoviť laboratórium a tak sa dosiahne optimálna frekvencia dvojjadrových buniek v kontrolných kultúrach s rozpúšťadlom/nosičom. Vhodná koncentrácia cytoB je zvyčajne medzi 3 až 6 μg/ml.

▼**M3**

Meranie proliferácie buniek a cytotoxicity a výber expozičných koncentrácií

22. Pri stanovovaní najvyššej koncentrácie testovanej látky je potrebné vyhýbať sa koncentráciám, ktoré majú schopnosť vyvolať falošné pozitívne odozvy, ako napríklad vytváranie nadmernej cytotoxicity, zrážanie kultivačného média a výrazné zmeny v hodnote pH alebo osmolality (39) (40) (41).

23. Vykonávajú sa merania proliferácie buniek, aby sa zaistilo, že ošetrené bunky prešli mitózou počas skúšky a že ošetrenia sa vykonali na vhodných úrovniach cytotoxicity (pozri odsek 29). Cytotoxicita by sa mala stanoviť pomocou metabolickej aktivácie a bez nej v bunkách, ktoré si vyžadujú metabolickú aktiváciu s použitím relatívneho zvýšenia počtu buniek (RICC) alebo relatívneho zdvojenia populácie (RPD) (pozri vzorce v dodatku 2), okrem prípadov, keď sa použije cytoB. Ak sa použije cytoB, možno stanoviť cytotoxicitu pomocou indexu replikácie (RI) (pozri vzorec v dodatku 2).

24. Ošetrenie kultúr pomocou cytoB a meranie relatívnych frekvencií jednojadrových, dvojjadrových a viacjadrových buniek v kultúre predstavuje presnú metódu kvantifikácie účinku na proliferáciu buniek a cytotoxickej alebo cytostatickej aktivity ošetrenia (5) a zabezpečuje, že sú hodnotené len tie bunky, ktoré sa delili počas ošetrenia alebo po ňom.

25. V rámci štúdií využívajúcich cytoB možno kvantifikovať cytostázu/cytotoxicitu pomocou proliferačného indexu blokovania cytokinézy (CBPI) (5) (26) (56) alebo ich možno odvodiť pomocou indexu replikácie (RI) z minimálneho počtu 500 buniek na kultúru (pozri vzorce v dodatku 2). Ak sa cytoB použije na posúdenie proliferácie buniek, CBPI alebo RI by sa mali stanoviť z minimálneho počtu 500 buniek na kultúru. Tieto merania možno okrem iného použiť na odhadovanie cytotoxicity, a to porovnaním hodnôt ošetrených a kontrolných kultúr. Posúdenie iných markerov cytotoxicity (napr. zhluky, počet buniek, apoptóza, nekróza, počet metafáz) môže poskytnúť užitočné informácie.

26. V rámci štúdií, ktoré nevyužívajú cytoB, je potrebné preukázať, že bunky, ktoré sa v kultúre vyhodnocujú, prešli delením počas ošetrenia testovanou látkou alebo po ošetrení, v opačnom prípade môžu vzniknúť falošné negatívne odozvy. Metódy, ktoré sa využívajú na zabezpečenie toho, aby sa hodnotili delené bunky, zahŕňajú začlenenie a následnú detekciu brómdeoxyuridínu (BrdU) na identifikáciu replikovaných buniek (57), tvorbu klonov, keď sa bunky z permanentných bunkových línií ošetrili a vyhodnotili *in situ* na mikroskopickom sklíčku [proliferačný index (PI)] (25) (26) (27) (28), alebo meranie relatívneho zdvojenia populácie (RPD), relatívneho zvýšenia počtu buniek (RICC) alebo iné validované metódy (16) (56) (58) (59) (pozri vzorce v dodatku 2). Posúdenie iných markerov cytotoxicity alebo cytostázy (napr. zhluky, počet buniek, apoptóza, nekróza, počet metafáz) môže poskytnúť užitočné informácie.

27. Mali by sa hodnotiť minimálne tri analyzovateľné testovacie koncentrácie. Na tento účel bude možno potrebné vykonať pokus s použitím väčšieho počtu koncentrácií s tesným odstupom a analyzovať tvorbu mikrojadier v týchto koncentráciách, ktoré poskytujú vhodný rozsah cytotoxicity. Alternatívne možno vykonať predbežný test cytotoxicity s cieľom zúžiť rozsah pre konečné testovanie.

28. Najvyššia koncentrácia by mala vyvolať 55 ± 5 % cytotoxicitu. Vyššie úrovne môžu ako vedľajší účinok cytotoxicity indukovať poškodenie chromozómov (60). Pri výskyte cytotoxicity by vybrané testované koncentrácie mali pokrývať rozsah od koncentrácie, ktorá vyvolá 55 ± 5 % cytotoxicitu, až po koncentrácie, ktoré vyvolajú malú alebo žiadnu toxicitu.

▼M3

29. Ak nie je pozorovaná žiadna cytotoxicita ani zrazenina, mala by sa najvyššia testovaná koncentrácia rovnať 0,01 M, 5 mg/mL alebo 5 µl/mL, podľa toho, ktorá je najnižšia. Medzi koncentráciami vybranými na analýzu by vo všeobecnosti mal byť odstup, ktorý nie je väčší ako 10. Pri testovaných látkach, ktoré sa vyznačujú strmou krivkou odozvy na koncentráciu, by odstup medzi koncentráciami testovaných látok mal byť menší, aby bolo možné hodnotiť aj kultúry s miernym a malým rozsahom toxicity.

30. Ak je obmedzujúcim faktorom rozpustnosť, mala by byť maximálnou koncentráciou – ak nie je obmedzená cytotoxicitou – najnižšia koncentrácia, pri ktorej je v kultúrach pozorovateľné minimálne zrážanie za predpokladu, že nenarúša hodnotenie. Hodnotenie zrážania by sa malo vykonávať pomocou metód, ako je napríklad svetelná mikroskopia, pričom sa zaznamenáva pretrvávajúca zrazenina alebo zrazenina, ktorá sa objaví počas kultivácie (na konci ošetrenia).

Kontroly

31. Každý pokus má obsahovať súbežné pozitívne kontroly a kontroly s rozpúšťadlom/nosičom s metabolickou aktiváciou i bez nej.

32. Pozitívne kontroly sú potrebné na preukázanie schopnosti použitých buniek a testovacieho protokolu identifikovať klastogény a aneugény a potvrdiť metabolickú schopnosť preparátu S9. Pozitívne kontroly by mali využívať známe látky, ktoré indukujú tvorbu mikrojadier pri koncentráciách, pri ktorých sa očakáva malý, ale reprodukovateľný nárast na pozadí, a ktoré preukážu citlivosť testovacieho systému. Koncentrácie pozitívnej kontroly by sa mali voliť tak, aby boli účinky jasné, ale aby pozorovateľovi neodhaľovali ihneď identitu kódovaných sklíčok.

33. Klastogén, ktorý si vyžaduje metabolickú aktiváciu (napríklad cyklofosfamid; benzo[a]pyrén), by sa mal použiť na preukázanie metabolickej schopnosti, ako aj schopnosti testovacieho systému detekovať klastogény. V prípade opodstatnenosti možno použiť aj iné pozitívne kontroly. Keďže niektoré pozitívne kontroly, ktoré si vyžadujú metabolickú aktiváciu, môžu byť za určitých podmienok ošetrovania alebo v určitých bunkových líniách aktívne aj bez exogénnej metabolickej aktivácie, mala by sa otestovať potreba metabolickej aktivácie a aktivita preparátu S9 vo vybranej bunkovej línii a pri vybraných koncentráciách.

34. V súčasnosti nie sú známe žiadne aneugény, ktoré si vyžadujú metabolickú aktiváciu svojej genotoxickej aktivity (16). Momentálne akceptované pozitívne kontroly pre aneugenickú aktivitu sú napríklad: kolchicín a vinblastín. Iné chemikálie sa môžu použiť, ak indukujú tvorbu mikrojadier iba pomocou aneugenickej aktivity alebo predovšetkým pomocou nej. Aby sa predišlo potrebe použiť dve pozitívne kontroly (pre klastogenicitu a aneugenicitu) bez metabolickej aktivácie, môže kontrola pre aneugenicitu slúžiť ako pozitívna kontrola bez S9 a kontrola pre klastogenicitu ako test primeranosti použitého systému metabolickej aktivácie. Pozitívna kontrola pre klastogenicitu, ako aj aneugenicitu by sa mala použiť pri tých bunkách, ktoré si nevyžadujú použitie S9. Navrhované pozitívne kontroly sú uvedené v dodatku 3.

35. Použitie pozitívnych kontrol týkajúcich sa chemických tried možno zvážiť, ak sú dostupné vhodné chemikálie. Všetky použité pozitívne kontroly by mali byť vhodné pre konkrétny bunkový typ a podmienky aktivácie.

▼M3

36. Do každého odberu by sa mali zahrnúť kontroly s rozpúšťadlom/nosičom. Zároveň by sa mali použiť aj neošetrené negatívne kontroly (bez rozpúšťadla/nosiča) okrem prípadov, keď existujú zverejnené alebo laboratórne historické kontrolné údaje, ktoré potvrdzujú, že vybrané rozpúšťadlo pri použitej koncentrácii nemá genotoxické ani iné škodlivé účinky.

TESTOVACÍ POSTUP

Harmonogram ošetrovania

37. S cieľom maximalizovať pravdepodobnosť detekcie aktivity aneugénu alebo klastogénu účinkujúceho v konkrétnom štádiu bunkového cyklu je dôležité, aby počas všetkých štádií bunkového cyklu bol ošetrený dostatočný počet buniek testovanou látkou. Harmonogram ošetrovania bunkových línií a primárnych bunkových kultúr sa teda môže mierne odlišovať od harmonogramu ošetrovania lymfocytov, ktoré si vyžadujú mitogénnu stimuláciu na to, aby sa začal ich bunkový cyklus, a tieto sú uvedené v odsekoch 41 – 43 (16).

38. Teoretické úvahy, ako aj zverejnené údaje (18) naznačujú, že väčšinu aneugénov a klastogénov možno určiť na základe krátkodobého ošetrenia počas 3 až 6 hodín s použitím S9 a bez použitia S9, po ktorom nasleduje odobranie testovanej látky a rastové obdobie trvajúce 1,5 – 2,0-násobok bunkových cyklov (6). Z buniek sa odoberajú vzorky v čase približne 1,5 – 2,0-násobku dĺžky bežného (t. j. neošetreného) bunkového cyklu, a to na začiatku alebo na konci ošetrenia (pozri tabuľku 1). Čas odberu vzoriek alebo čas regenerácie možno predĺžiť, ak je známe alebo ak existuje podozrenie, že testovaná látka ovplyvňuje čas bunkového cyklu (napríklad pri testovaní nukleozidových analógov).

39. Kvôli možnej cytotoxicite preparátu S9 pre kultivované bunky cicavcov sa predĺžené expozičné ošetrenie počas 1,5 – 2,0-násobku bežného bunkového cyklu použije len bez S9. Pri predĺženom ošetrení možno ošetriť bunky testovanou chemikáliou s použitím alebo bez použitia cytoB. Tieto možnosti sa vzťahujú na situácie, pri ktorých môže existovať obava, že dôjde k možným interakciám medzi testovanou látkou a cytoB.

40. Navrhovaný harmonogram ošetrovania buniek je uvedený v tabuľke 1. Tento všeobecný harmonogram ošetrovania možno upraviť v závislosti od stability alebo reaktivity testovanej látky alebo od konkrétnych charakteristík rastu použitých buniek. Všetky ošetrenia by sa mali začať a ukončiť počas exponenciálneho rastu buniek. Harmonogram je detailnejšie opísaný v odsekoch 41 – 47.

Tabuľka 1

Čas ošetrovania a zberu buniek pri skúške MNvit

Lymfocyty, primárne bunky a bunkové línie ošetrené cytoB	+ S9	ošetrujte 3 – 6 hodín s použitím S9; odstráňte S9 a ošetrovacie médium; pridajte čerstvé médium a cytoB; bunky odoberte po 1,5 – 2,0-násobku bežného bunkového cyklu
	– S9 krátka expozícia	ošetrujte 3 – 6 hodín; odstráňte ošetrovacie médium; pridajte čerstvé médium a cytoB; bunky odoberte po 1,5 – 2,0-násobku bežného bunkového cyklu

▼M3

	– S9 predĺžená expozícia	*možnosť A:* ošetrujte 1,5 – 2,0-násobok bežného bunkového cyklu s použitím cytoB; bunky odoberte na konci expozičného času; *možnosť B:* ošetrujte 1,5 – 2,0-násobok bežného bunkového cyklu; odstráňte testovanú látku; pridajte čerstvé médium a cytoB; bunky odoberte po 1,5 – 2,0-násobku bežného bunkového cyklu

Bunkové línie ošetrené bez cytoB

(Rovnaký postup ako pri harmonograme ošetrovania uvedenom vyššie s tou výnimkou, že sa nepridáva cytoB)

Lymfocyty, primárne bunky a bunkové línie s použitím cytoB

41. Najúčinnejší prístup pri lymfocytoch je začať expozíciu testovanej látke 44 – 48 hodín po stimulácii PHA, keď sa synchronizácia cyklu stratí (5). V počiatočnej skúške sa bunky ošetrujú 3 až 6 hodín testovanou látkou bez S9 a s použitím S9. Ošetrovacie médium sa odstráni a nahradí čerstvým médiom, ktoré obsahuje cytoB, a bunky sa odoberú po 1,5 – 2-násobku bežného bunkového cyklu.

42. Ak sú obidva počiatočné testy krátkeho ošetrenia (3 – 6 hodín) negatívne alebo nejasné, v následnom predĺženom expozičnom ošetrení sa S9 nepoužije. K dispozícii sú dve možnosti ošetrenia a sú rovnako prijateľné. Môže byť však vhodnejšie postupovať pri stimulácii lymfocytov podľa možnosti A, kde sa exponenciálny rast môže 96 hodín po stimulácii znižovať. Okrem toho by kultúry buniek do finálneho odberu vzoriek v možnosti B nemali dosiahnuť zhluk.

— Možnosť A: Bunky sú ošetrované testovanou látkou počas 1,5 – 2,0-násobku bežného bunkového cyklu a odobrané na konci obdobia ošetrenia.

— Možnosť B: Bunky sú ošetrované testovanou látkou počas 1,5 – 2,0-násobku bežného bunkového cyklu. Ošetrovacie médium sa odstráni a nahradí čerstvým médiom a bunky sa odoberú po ďalšom 1,5 – 2-násobku bežného bunkového cyklu.

43. Primárne bunky a bunkové línie by sa mali ošetriť podobným spôsobom ako lymfocyty s výnimkou toho, že stimulácia PHA 44 – 48 hodín nie je potrebná. Iné bunky ako lymfocyty by mali byť vystavené tak, aby sa bunky v čase ukončenia štúdie stále nachádzali v log fáze rastu.

Bunkové línie bez cytoB

44. Bunky by sa mali ošetriť počas 3 – 6 hodín s použitím aj bez použitia S9. Ošetrovacie médium sa odstráni a nahradí čerstvým médiom a bunky sa odoberú po 1,5 – 2-násobku bežného bunkového cyklu.

▼M3

45. Ak sú obidva počiatočné testy krátkeho ošetrenia (3 – 6 hodín) negatívne alebo nejasné, nasleduje predĺžené expozičné ošetrenie (bez S9). K dispozícii sú dve možnosti ošetrenia, z ktorých obidve sú rovnako prijateľné:

— Možnosť A: Bunky sú ošetrované testovanou látkou počas 1,5 – 2,0-násobku bežného bunkového cyklu a odobrané na konci obdobia ošetrenia.

— Možnosť B: Bunky sú ošetrované testovanou látkou počas 1,5 – 2,0-násobku bežného bunkového cyklu. Ošetrovacie médium sa odstráni a nahradí čerstvým médiom a bunky sa odoberú po ďalšom 1,5 – 2-násobku bežného bunkového cyklu.

46. V monovrstvách môžu byť na konci 3 – 6-hodinového ošetrenia prítomné mitotické bunky (možno ich identifikovať ako okrúhle a oddeľujúce sa od povrchu). Keďže tieto mitotické bunky sa dajú jednoducho oddeliť, je možné, že sa pri odstraňovaní média obsahujúceho testovanú látku stratia. Preto ich pri umývaní kultúr treba opatrne odobrať a následne vrátiť ku kultúram s cieľom predísť strate buniek v mitóze a riziku pre mikrojadrá v čase zberu.

Počet kultúr

47. Duplicitné kultúry by sa mali použiť pre každú koncentráciu testovanej látky a pre kultúry s rozpúšťadlom/nosičom a kultúry na negatívnu kontrolu. Ak z historických laboratórnych údajov možno preukázať minimálnu variáciu medzi duplicitnými kultúrami, môže byť prijateľné použitie jednotlivých kultúr. Ak sú použité jednotlivé kultúry, odporúča sa, aby sa analyzoval zvýšený počet koncentrácií.

Odber buniek a príprava sklíčok

48. Každá kultúra sa odoberá a spracúva samostatne. Príprava buniek môže zahŕňať hypotonické ošetrenie, ale tento krok nie je potrebný, ak sa primerané šírenie buniek dosiahne iným spôsobom. Pri príprave sklíčok možno použiť rôzne techniky za predpokladu, že sa získajú vysokokvalitné bunkové preparáty. Cytoplazma bunky by sa mala zachovať, aby bola možná detekcia mikrojadier a (pri metóde blokovania cytokinézy) spoľahlivá identifikácia dvojjadrových buniek.

49. Sklíčka možno zafarbiť rôznymi metódami, napríklad farbivom Giemsa alebo fluorescenčným farbivom špecifickým pre DNA (59). Použitie špecifického farbiva DNA [napríklad akridínová oranžová (61) alebo Hoechst 33258 plus pyronín-Y (62)] môže eliminovať niektoré umelo vzniknuté štruktúry buniek spojené s používaním farbiva nešpecifického pre DNA. Protilátky kinetochoru, FISH (fluorescenčná hybridizácia *in situ*) s pancentromerérovými sondami DNA alebo značenie *in situ* pomocou primerov špecifických pre pancentroméru spolu s vhodným odfarbovacím roztokom DNA možno použiť na identifikáciu obsahov mikrojadier (chromozómy/fragmenty chromozómov), ak sú predmetom záujmu mechanické informácie o ich tvorbe (15) (16). Na rozlišovanie medzi klastogénmi a aneugénmi možno použiť aj iné metódy, ak sa ukázalo, že sú účinné.

Analýza

50. Všetky sklíčka vrátane sklíčok s rozpúšťadlom/nosičom a kontrolami by sa pred mikroskopickou analýzou mali nezávisle označiť kódmi. Prípadne sa kódované vzorky môžu analyzovať pomocou validovaného systému na automatickú tokovú cytometrickú alebo vizuálnu analýzu.

▼M3

51. V kultúrach ošetrených cytoB by sa frekvencie mikrojadier mali analyzovať aspoň v 2 000 dvojjadrových bunkách na jednu koncentráciu (aspoň 1 000 dvojjadrových buniek na kultúru; dve kultúry na jednu koncentráciu). Ak sa použijú jednotlivé kultúry, malo by sa z jednej kultúry vyhodnotiť aspoň 2 000 dvojjadrových buniek na jednu koncentráciu. Ak je na hodnotenie k dispozícii podstatne menej ako 1 000 dvojjadrových buniek na kultúru alebo menej ako 2 000 dvojjadrových buniek, ak sa použije jediná kultúra a ak sa nezistí významné zvýšenie mikrojadier, test by sa mal zopakovať s použitím viacerých buniek alebo pri koncentráciách s menšou toxicitou, podľa toho, ktorá možnosť je vhodná. Malo by sa dbať na to, aby sa nehodnotili dvojjadrové bunky nepravidelného tvaru ani bunky, ktorých jadrá sa výrazne odlišujú veľkosťou. Malo by sa dbať aj na to, aby nedošlo k zámene dvojjadrových buniek za mnohojadrové bunky, ktorých šírenie bolo nedostatočné. Bunky obsahujúce viac ako dve hlavné jadrá by sa nemali analyzovať na prítomnosť mikrojadier, keďže základná frekvencia mikrojadra môže byť v týchto bunkách vyššia (63) (64). Hodnotenie jednojadrových buniek je prijateľné v prípade, ak testovaná látka interferuje s aktivitou cytoB.

52. V bunkových líniách analyzovaných bez ošetrenia cytoB by sa mikrojadrá mali hodnotiť aspoň v 2 000 bunkách na jednu koncentráciu (aspoň v 1 000 bunkách na kultúru, dve kultúry na jednu koncentráciu). Ak sa použije iba jedna kultúra na koncentráciu, malo by sa z nej vyhodnotiť aspoň 2 000 buniek.

53. Pri použití cytoB by sa mal určiť index CBPI alebo RI, aby sa posúdila proliferácia bunky (pozri dodatok 2) s použitím aspoň 500 buniek na kultúru. Pri ošetrení bez použitia cytoB je nevyhnutné poskytnúť dôkaz, že vyhodnocované bunky proliferovali, ako sa uvádza v odsekoch 24 – 27.

Kritériá prijateľnosti

54. Laboratórium, ktoré navrhuje použiť skúšku MNvit opísanú v tejto testovacej metóde, by malo preukázať svoju schopnosť spoľahlivo a presne zisťovať chemikálie so známou aneugénnou a klastogénnou aktivitou, či už s metabolickou aktiváciou, alebo bez nej, ako aj známe negatívne chemikálie pomocou referenčných chemikálií uvedených v dodatku 3. Ako dôkaz schopnosti správne vykonať túto testovaciu metódu by laboratórium malo poskytnúť dôkaz, že bunky, v ktorých sa hodnotí tvorba mikrojadra, ukončili jedno jadrové delenie, ak sa test vykonáva bez použitia cytoB.

55. Chemikálie uvedené v dodatku 3 sa odporúčajú na použitie ako referenčné chemikálie. Náhradné alebo doplňujúce chemikálie možno zahrnúť, ak je ich aktivita známa, ak vytvárajú mikrojadrá rovnakými mechanizmami pôsobenia a ak sa ukážu ako relevantné v porovnaní s chemikáliami, ktoré sa budú testovať postupom MNvit. Odôvodnenie by mohlo zahŕňať validačnú štúdiu, ktorá zapája veľké množstvo látok alebo sa sústredí na užšie spektrum založené na štúdii chemickej triedy testovanej látky alebo mechanizmu poškodenia.

56. Kontrolné kultúry s rozpúšťadlom/nosičom a neošetrené kultúry by mali mať z hľadiska reprodukovateľnosti a konzistentnosti nízke frekvencie mikrojadier (zvyčajne 5 – 25 mikrojadier/1 000 buniek, ktoré patria do druhov buniek uvedených v odseku 11). Ostatné druhy buniek môžu mať rôzny rozsah odoziev, čo by sa malo určiť pri validácii ich vhodnosti na použitie v skúške MNvit. Údaje z negatívnej kontroly, kontroly s rozpúšťadlom a z pozitívnej kontroly by sa mali použiť na stanovenie historických kontrolných rozsahov. Tieto hodnoty by sa mali použiť pri rozhodovaní o primeranosti súbežnej pozitívnej/negatívnej kontroly v pokuse.

▼M3

57. Ak sa navrhnú menšie zmeny protokolu skúšky (napr. použitie automatických namiesto manuálnych techník hodnotenia či použitie nového druhu bunky), je potrebné preukázať účinnosť zmeny skôr, ako takto upravený protokol možno považovať za prijateľný na použitie. Preukázanie účinnosti zahŕňa preukázanie schopnosti zisťovať hlavné mechanizmy chromozómového zlomu, nadbytku alebo straty a dosiahnuť vhodné pozitívne a negatívne výsledky pre triedu jednotlivej látky alebo pre celý rad látok, ktoré sa majú testovať.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

58. Ak sa použije metóda blokovania cytokinézy, pri hodnotení indukcie mikrojadier sa používajú iba frekvencie dvojjadrových buniek s mikrojadrami (bez ohľadu na počet mikrojadier v bunke). Hodnotenie počtu buniek s jedným mikrojadrom, s dvoma alebo viacerými mikrojadrami by mohlo poskytnúť užitočné informácie, ale nie je povinné.

59. Mali by sa určiť súbežné opatrenia v súvislosti s cytotoxicitou a/alebo cytostázou pre všetky ošetrené kultúry a kontrolné kultúry s rozpúšťadlom/nosičom (58). Pri všetkých ošetrených a kontrolných kultúrach by sa mali vypočítať indexy CBPI alebo RI, ktoré merajú oneskorenie bunkového cyklu pri použití metódy blokovania cytokinézy. V prípade, že sa nepoužíva cytoB, mali by sa použiť RDP alebo RICC, alebo index PI (pozri dodatok 2).

60. Mali by sa uvádzať údaje o jednotlivých kultúrach. Okrem toho by sa všetky údaje mali uvádzať v tabuľkovej podobe.

61. Chemikálie, ktoré indukujú mikrojadrá v skúške MNvit, tak môžu urobiť, pretože indukujú chromozómový zlom, stratu chromozómu alebo ich kombináciu. Ďalšiu analýzu, ktorá využíva protilátky kinetochoru, sondy *in situ* špecifické pre centroméry alebo iné metódy, možno použiť na určenie toho, či mechanizmus indukcie mikrojadra je následkom klastogénnej a/alebo aneugénnej aktivity.

Vyhodnocovanie a interpretácia výsledkov

62. Neexistuje požiadavka na overenie jasnej pozitívnej alebo negatívnej odozvy ďalším testovaním. Nejasné výsledky možno objasniť analýzou ďalších 1 000 buniek zo všetkých kultúr s cieľom zabrániť strate slepých testov. Ak sa týmto prístupom výsledok neobjasní, treba vykonať ďalšie testy. Modifikácia parametrov štúdie z dôvodu rozšírenia alebo zúženia rozsahu podmienok by sa mala zvážiť pri následných pokusoch, ak je to vhodné. Parametre štúdie, ktoré by sa mohli modifikovať, zahŕňajú odstup medzi testovanými koncentráciami, načasovanie ošetrenia a zber buniek a/alebo podmienky metabolickej aktivácie.

63. Na stanovenie pozitívneho výsledku existuje niekoľko kritérií, ako napríklad nárast súvisiaci s koncentráciou alebo štatisticky významné zvýšenie počtu buniek obsahujúcich mikrojadrá. Najskôr sa zvažuje biologická relevantnosť výsledkov. Zváženie toho, či pozorované hodnoty sú v rozsahu historickej kontroly alebo mimo neho, môže poskytnúť usmernenie pri hodnotení biologického významu odozvy. Ako pomôcky pri hodnotení výsledkov testov možno používať primerané štatistické metódy (65). Výsledky štatistických testov by sa však mali hodnotiť vzhľadom na vzťah medzi dávkou a odozvou. Mala by sa zohľadniť aj reprodukovateľnosť a historické údaje.

▼M3

64. Hoci väčšina pokusov poskytne jasne pozitívne alebo negatívne výsledky, v niektorých prípadoch súbor údajov vopred vylúči jednoznačné posúdenie aktivity testovanej látky. Tieto nejasné alebo spochybniteľné odozvy môžu nastať bez ohľadu na počet opakovaní pokusu.

65. Pozitívne výsledky skúšky MNvit naznačujú, že testovaná látka vyvoláva chromozómový zlom alebo stratu chromozómu v kultivovaných bunkách cicavcov. Negatívne výsledky naznačujú, že testovaná látka nevyvoláva v testovacích podmienkach chromozómové zlomy a/ani ich nadbytok či stratu v kultivovaných bunkách cicavcov.

Správa o teste

66. Správa o teste by mala obsahovať aspoň tieto informácie, ak sú relevantné pre uskutočnenie štúdie:

Testovaná chemikália:

— identifikačné údaje a registračné číslo CAS (Chemical Abstract Services) a číslo EC,

— fyzikálna povaha a čistota,

— fyzikálno-chemické vlastnosti relevantné pre uskutočnenie štúdie,

— reaktivita testovanej chemikálie v kultivačnom médiu s rozpúšťadlom/nosičom alebo v bunkovom kultivačnom médiu.

Rozpúšťadlo/nosič:

— zdôvodnenie výberu rozpúšťadla/nosiča,

— rozpustnosť a stabilita testovanej látky v rozpúšťadle/nosiči.

Bunky:

— typ a zdroj použitých buniek,

— vhodnosť použitého typu bunky,

— neprítomnosť mykoplazmy, ak je to vhodné,

— informácie o dĺžke bunkového cyklu, násobení času alebo proliferačnom indexe,

— pri použití lymfocytov pohlavie, vek a počet darcov krvi, ak je to vhodné,

— pri použití lymfocytov informácia o tom, či je vystavená celá krv, alebo oddelené lymfocyty,

— počet prechodov, ak je to vhodné,

— metódy udržiavania bunkových kultúr, ak je to vhodné,

— modálny počet chromozómov,

— trvanie bežného bunkového cyklu (negatívna kontrola).

Podmienky testovania:

— identita látky blokujúcej cytokinézu (napr. cytoB), ak je použitá, jej koncentrácia a trvanie expozície bunky,

— zdôvodnenie výberu koncentrácií a počtu kultúr vrátane údajov o cytotoxicite a obmedzeniach rozpustnosti, ak sú dostupné,

— skladba média, koncentrácia CO_2, ak je to vhodné,

— koncentrácie testovanej látky,

▼M3

— koncentrácia (a/alebo objem) nosiča a pridanej testovanej látky,

— inkubačná teplota a inkubačná doba,

— trvanie ošetrenia,

— čas zberu po ošetrení,

— hustota buniek pri zapustení, ak je to vhodné,

— typ a zloženie systému metabolickej aktivácie vrátane kritérií prijateľnosti,

— chemikálie na pozitívne kontroly a negatívne kontroly,

— použité metódy prípravy sklíčok a metóda farbenia,

— kritériá na identifikáciu mikrojadier,

— počet analyzovaných buniek,

— metódy merania cytoxicity,

— všetky doplňujúce informácie týkajúce sa cytotoxicity,

— kritériá hodnotenia štúdií ako pozitívnych, negatívnych alebo nejasných,

— metóda(-y) použitej štatistickej analýzy,

— metódy, ako napríklad použitie protilátky kinetochoru s cieľom charakterizovať, či mikrojadrá obsahujú celé chromozómy, alebo fragmenty chromozómov, ak je to vhodné.

Výsledky:

— meranie použitej cytotoxicity, napr. CBPI alebo RI, v prípade použitia metódy blokovania cytokinézy, RICC, RPD alebo PI, keď sa metódy blokovania cytokinézy nepoužívajú, ďalšie pozorovania, ak je to vhodné, napr. zhluk buniek, apoptóza, nekróza, počítanie metafáz, frekvencia dvojjadrových buniek,

— príznaky zrážania,

— údaje o hodnotách pH a osmolality ošetrovacieho média, ak sú stanovené,

— definovanie buniek prijateľných na analýzu,

— distribúcia jednojadrových, dvojjadrových a viacjadrových buniek pri použití metódy blokovania cytokinézy,

— počet buniek s mikrojadrami uvedený oddelene pre každú ošetrenú a kontrolnú kultúru a stanovenie, či pochádzajú z dvojjadrových, alebo jednojadrových buniek, ak je to potrebné,

— vzťah medzi koncentráciou a odozvou, ak ho možno určiť,

— údaje o chemikáliách na súbežné negatívne (rozpúšťadlo/nosič) a pozitívne kontroly (koncentrácie a rozpúšťadlá),

— historické údaje o chemikáliách na negatívne (rozpúšťadlo/nosič) a pozitívne kontroly obsahujúce rozsahy, stredné hodnoty a štandardnú odchýlku a stupeň spoľahlivosti (napr. 95 %),

— štatistická analýza, p-hodnoty, ak existujú.

Rozbor výsledkov

Závery

▼M3

LITERATÚRA

1. Kirsch-Volders, M. (1997), Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Res.*, 392, 1 – 4.

2. Parry, J. M. and Sors, A. (1993), The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project, *Mutation Res.*, 287, 3 – 15.

3. Fenech, M. and Morley, A. A. (1985), Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay, *Cytobios.*, 43, 233 – 246.

4. Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr, Lorge, E., Norppa, H., Surralles, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2000), Report from the *In Vitro* Micronucleus Assay Working Group, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35, 167 – 172.

5. Fenech, M. (2007), Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nature Protocols, 2* (5), 1084 – 1104.

6. Fenech, M. and Morley, A. A. (1986), Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of *in-vivo* ageing and low dose X-irradiation, *Mutation Res.*, 161, 193 – 198.

7. Eastmond, D. A. and Tucker, J. D. (1989), Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody, *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 34 – 43.

8. Eastmond, D. A. and Pinkel, D. (1990), Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence *in-situ* hybridisation with chromosome-specific DNA probes, *Mutation Res.*, 234, 9 – 20.

9. Miller, B. M., Zitzelsberger, H. F., Weier, H. U. and Adler, I. D. (1991), Classification of micronuclei in murine erythrocytes: immunofluorescent staining using CREST antibodies compared to *in situ* hybridization with biotinylated gamma satellite DNA, *Mutagenesi.*, 6, 297 – 302.

10. Farooqi, Z., Darroudi, F. and Natarajan, A. T. (1993), The use of fluorescence *in-situ* hybridisation for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes, *Mutagenesi.*, 8, 329 – 334.

11. Migliore, L., Bocciardi, R., Macri, C. and Lo Jacono, F. (1993), Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a centromeric probe, *Mutation Res.*, 319, 205 – 213.

12. Norppa, H., Renzi, L. and Lindholm, C. (1993), Detection of whole chromosomes in micronuclei of cytokinesis-blocked human lymphocytes by antikinetochore staining and *in situ* hybridization, *Mutagenesi.*, 8, 519 – 525.

13. Eastmond, D. A, Rupa, D. S. and Hasegawa, L. S. (1994), Detection of hyperdiploidy and chromosome breakage in interphase human lymphocytes following exposure to the benzene metabolite hydroquinone using multicolor fluorescence *in situ* hybridization with DNA probes, *Mutation Res.*, 322, 9 – 20.

14. Marshall, R. R., Murphy, M., Kirkland, D. J. and Bentley, K. S. (1996), Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy, *Mutation Res.*, 372, 233 – 245.

15. Zijno, P., Leopardi, F., Marcon, R. and Crebelli, R. (1996), Analysis of chromosome segregation by means of fluorescence *in situ* hybridization: application to cytokinesis-blocked human lymphocytes, *Mutation Res.*, 372, 211 – 219.

16. Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate Jr., M., Lorge, E., Norppa, H., Surrallés, J., von der Hude, W. and Wakata, A. (2003), Report from the *in vitro* micronucleus assay working group. *Mutation Res.*, 540, 153 – 163.

▼M3

17. OECD (1997), *In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Tes.*, Test Guideline No 473, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [www.oecd.org/env/testguidelines].

18. Lorge, E., Thybaud, V., Aardema, M. J., Oliver, J., Wakata, A., Lorenzon G. and Marzin, D. (2006), SFTG International collaborative Study on *in vitro* micronucleus test. I. General conditions and overall conclusions of the study, *Mutation Res.*, 607, 13 – 36.

19. Clare, G., Lorenzon, G., Akhurst, L. C., Marzin, D., van Delft, J., Montero, R., Botta, A., Bertens, A., Cinelli, S., Thybaud, V. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test. II. Using human lymphocytes, *Mutation Res.*, 607, 37 – 60.

20. Aardema, M. J., Snyder, R. D., Spicer, C., Divi, K., Morita, T., Mauthe, R. J., Gibson, D. P., Soelter, S., Curry, P. T., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, III. Using CHO cells, *Mutation Res.*, 607, 61 – 87.

21. Wakata, A., Matsuoka, A., Yamakage, K., Yoshida, J., Kubo, K., Kobayashi, K., Senjyu, N., Itoh, S., Miyajima, H., Hamada, S., Nishida, S., Araki, H., Yamamura, E., Matsui, A., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, IV. Using CHO/IU cells, *Mutation Res.*, 607, 88 – 124.

22. Oliver, J., Meunier, J.-R., Awogi, T., Elhajouji, A., Ouldelhkim, M.-C., Bichet, N., Thybaud, V., Lorenzon, G., Marzin, D. and Lorge, E. (2006), SFTG International collaborative study on the *in vitro* micronucleus test, V. Using L5178Y cells, *Mutation Res.*, 607, 125 – 152.

23. Albertini, S., Miller, B., Chetelat, A. A. and Locher, F. (1997), Detailed data on *in vitro* MNT and *in vitro* CA: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 187 – 208.

24. Miller, B., Albertini, S., Locher, F., Thybaud, V. and Lorge, E. (1997), Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the *in vitro* chromosome aberration test: industrial experience, *Mutation Res.*, 392, 45 – 59.

25. Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D. and Madle, S. (1998), Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the *in vitro* micronucleus test. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung, *Mutation Res.*, 410, 81 – 116.

26. Kalweit, S., Utesch, U., von der Hude, W. and Madle, S. (1999), Chemically induced micronucleus formation in V79 cells – comparison of three different test approaches, *Mutation Res.* 439, 183 – 190.

27. Kersten, B., Zhang, J., Brendler Schwaab, S. Y., Kasper, P. and Müller, L. (1999), The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity, *Mutation Res.* 445, 55 – 71.

28. von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H. G., Honarvar, N., Fahrig, R., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H. and Madle, S. (2000), *In vitro* micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells – results of a collaborative study with *in situ* exposure to 26 chemical substances, *Mutation Res.*, 468, 137 – 163.

29. Garriott, M. L., Phelps, J. B. and Hoffman, W. P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test, I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 517, 123 – 134.

30. Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M. Jr., Miura, K. F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K. and Sofuni, T. (1999), Validation study of the *in vitro* micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU), *Mutagenesi.*, 14, 569 – 580.

▼M3

31. Elhajouji, A., and Lorge, E. (2006), Special Issue: SFTG International collaborative study on *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 607, 1 – 152.

32. ECVAM (2006), Statement by the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Scientific Advisory Committee (ESAC) on the scientific validity of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay for genotoxicity testing. 25. stretnutie ESAC, 16. a 17. novembra 2006. K dispozícii na stránke: [http://ecvam.jrc.it/index.htm].

33. ESAC (2006), ECVAM Scientific Advisory Committee (ESAC) Peer Review, Retrospective Validation of the In Vitro Micronucleus Test, Summary and Conclusions of the Peer Review Panel. K dispozícii na stránke: [http://ecvam.jrc.it/index.htm].

34. Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhler, S, van Benthem, J., Vanparys P. (2008), ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT), *Mutagenesi.*, 23, 271 – 283.

35. Zhang, L. S., Honma, M., Hayashi, M., Suzuki, T., Matsuoka, A. and Sofuni, T. (1995), A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the *in vitro* micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, 105 – 115.

36. Ehrlich, V., Darroudi, F., Uhl, M., Steinkellner, S., Zsivkovits, M. and Knasmeuller, S. (2002), Fumonisin B_1 is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells, *Mutagenesi.*, 17, 257 – 260.

37. Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W. W., Hoelzl, C., Bichler, J. and Majer, B. J. (2004), Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge, *Toxicol.*, 198, 315 – 328.

38. Gibson, D. P., Brauninger, R., Shaffi, H. S., Kerckaert, G. A., LeBoeuf, R. A., Isfort, R. J. and Aardema, M. J. (1997), Induction of micronuclei in Syrian hamster embryo cells: comparison to results in the SHE cell transformation assay for National Toxicology Program test chemicals, *Mutation Res.*, 392, 61 – 70.

39. Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), International Commission for Protection Against Environmental Mutagens and Carcinogens, Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, 147 – 205.

40. Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K. (1992), Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells, *Mutation Res.*, 268, 297 – 305.

41. Brusick, D. (1986), Genotoxic effects in cultured mammalian cells produced by low pH treatment conditions and increased ion concentrations, *Environ. Mutagen.*, 8, 789 – 886.

42. Fenech, M. and Morley, A. A. (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes, *Mutation Res.*, 147, 29 – 36.

43. Fenech, M. (1997), The advantages and disadvantages of cytokinesis-blood micronucleus method, *Mutation Res.*, 392, 11 – 18.

44. Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y. P., Ceppi, M., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M. P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L. R., Fucic, A., Lima, O. G., Hrelia, P., Krishnaja, A. P., Lee, T. K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W. U., Odagiri, Y., Scarffi, M. R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. and Zijno, A. (2001), HUman MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes, I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria and host factors on the frequency of micronuclei, *Environ. Mol. Mutagen.* 37, 31 – 45.

▼**M3**

45. Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised methods for the Salmonella mutagenicity test, *Mutation Res.*, 113, 173 – 215.

46. Ong, T.-M., Mukhtar, M., Wolf, C. R. and Zeiger, E. (1980), Differential effects of cytochrome P450-inducers on promutagen activation capabilities and enzymatic activities of S-9 from rat liver, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4, 55 – 65.

47. Elliott, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in-vitro* genotoxicity assays. *Mutagenesis*, 7, 175 – 177.

48. Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A safe substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer of Metabolic Activation Systems, *In:* de Serres, F. J., Fouts, J. R., Bend, J. R. and Philpot, R. M. (eds), *In Vitro* Metabolic Activation in Mutagenesis Testing, Elsevier, North-Holland, s. 85 – 88.

49. Johnson, T. E., Umbenhauer, D. R. and Galloway, S. M. (1996), Human liver S-9 metabolic activation: proficiency in cytogenetic assays and comparison with phenobarbital/beta-naphthoflavone or Aroclor 1254 induced rat S-9, *Environ. Mol. Mutagen.*, 28, 51 – 59.

50. UNEP (2001), Štokholmský dohovor o perzistentných organických látkach, Program OSN pre životné prostredie (UNEP). K dispozícii na stránke: [http://www.pops.int/].

51. Doherty, A. T., Ellard, S., Parry, E. M. and Parry, J. M. (1996), An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells, *Mutagenesi.*, 11, 247 – 274.

52. Krahn, D. F., Barsky, F. C. and McCooey, K. T. (1982), CHO/HGPRT Mutation Assay: Evaluation of Gases and Volatile Liquids, *In:* Tice, R. R., Costa, D. L. and Schaich, K. M. (eds), Genotoxic Effects of Airborne Agents. New York, Plenum, s. 91 – 103.

53. Zamora, P. O., Benson, J. M., Li, A. P. and Brooks, A. L. (1983), Evaluation of an exposure system using cells grown on collagen gels for detecting highly volatile mutagens in the CHO/HGPRT mutation assay, *Environ. Mutagenesis* 5, 795 – 801.

54. Fenech, M. (1993), The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutation Res.*, 285, 35 – 44.

55. Phelps, J. B., Garriott, M. L., and Hoffman, W. P. (2002), A protocol for the *in vitro* micronucleus test. II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity, *Mutation Res.*, 521, 103 – 112.

56. Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M. Jr., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surralles, J., Vanhauwaert, A. and Wakata, A. (2004), Corrigendum to „Report from the *in vitro* micronucleus assay working group“, *Mutation Res.*, 564, 97 – 100.

57. Pincu, M., Bass, D. and Norman, A. (1984), An improved micronuclear assay in lymphocytes, *Mutation Res.*, 139, 61 – 65.

58. Lorge, E., Hayashi, M., Albertini, S. and Kirkland, D. (2008), Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the *in vitro* micronucleus test. I. Theoretical aspects, *Mutation Res.*, 655, 1 – 3.

59. Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. and Marcos, R. (1995), Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 341, 169 – 184.

60. Galloway, S. (2000), Cytotoxicity and chromosome aberrations *in vitro*: Experience in industry and the case for an upper limit on toxicity in the aberration assay, Environ. Molec. *Mutagenesis* 35, 191 – 201.

▼**M3**

61. Hayashi, M., Sofuni, T., and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, 241 – 247.

62. MacGregor, J. T., Wehr, C. M., and Langlois, R. G. (1983), A Simple Fluorescent Staining Procedure for Micronuclei and RNA in Erythrocytes Using Hoechst 33258 and Pyronin Y, *Mutation Res.*, 120, 269 – 275.

63. Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test, *Mutation Res.*, 120, 241 – 247.

64. Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E. (2003), HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures, *Mutation Res.*, 534, 65 – 75.

65. Hoffman, W. P., Garriott, M. L. and Lee, C. (2003), *In vitro* micronucleus test, *In:* Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics, Second edition. S. Chow (ed.), Marcel Dekker, Inc. New York, NY, s. 463 – 467.

66. Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 850/2004 z 29. apríla 2004 o perzistentných organických znečisťujúcich látkach, ktorým sa mení a dopĺňa smernica 79/117/EHS (Ú. v. EÚ L 229, 30.4.2004, s. 5).

▼M3

Dodatok 1

Vymedzenie pojmov

Aneugén: každá látka alebo proces, ktorý vzájomne pôsobí so zložkami cyklu mitotického a meiotického delenia buniek, a tým vedie k aneuploidii v bunkách alebo organizmoch.

Aneuploidia: akákoľvek odchýlka od bežného diploidného (alebo haploidného) počtu chromozómov vo forme jedného alebo viacerých chromozómov, ktoré netvoria celý(-é) súbor(-y) chromozómov (polyploidia).

Apoptóza: programovaná bunková smrť charakterizovaná sériou krokov, ktoré vedú k rozpadu buniek na častice spojené membránou, ktoré sú následne pohltené fagocytózou alebo uvoľnené.

Proliferácia buniek: zvýšenie počtu buniek v dôsledku mitotického delenia bunky.

Centroméra: oblasť chromozómu DNA, kde sa spájajú obe chromatídy a kde sú vedľa seba viazané oba kinetochory.

Klastogén: akákoľvek látka alebo proces, ktoré spôsobujú štrukturálne chromozómové odchýlky v populáciách buniek alebo organizmov.

Cytokinéza: proces delenia bunky, ktorý nasleduje ihneď po mitóze a v ktorom vznikajú dve dcérske bunky – každá s jedným jadrom.

Proliferačný index blokovania cytokinézy (CBPI): pomer druhého delenia buniek v ošetrenej populácii vo vzťahu k neošetrenej kontrole (pozri vzorec v dodatku 2).

Cytostáza: inhibícia rastu buniek (pozri vzorec v dodatku 2).

Cytotoxicita: škodlivé účinky na štruktúru alebo funkciu bunky, ktoré postupne spôsobia jej smrť.

Genotoxický: všeobecný výraz, ktorý zahŕňa všetky typy poškodenia DNA alebo chromozómov vrátane zlomov, aduktov, zmien usporiadania, mutácií, chromozómových odchýlok a aneuploidie. Nie všetky typy genotoxických účinkov majú za následok mutácie alebo trvalé poškodenie chromozómu.

Bunky v interfáze: bunky, ktoré nie sú v štádiu mitotického delenia.

Kinetochor: štruktúra obsahujúca bielkoviny, ktorá sa zhromažďuje na centromére chromozómu, na ktorú sa počas delenia buniek viažu vlákna deliaceho vretienka umožňujúce riadny pohyb dcérskych chromozómov k pólom dcérskych buniek.

Mikrojadrá: samostatné malé jadrá doplňujúce hlavné jadrá buniek, ktoré sa vytvárajú počas telofázy mitózy alebo meiózy zo zaostávajúcich chromozómových fragmentov alebo celých chromozómov.

Mitóza: rozdelenie bunkového jadra, ktoré sa zvyčajne delí na profázu, prometafázu, metafázu, anafázu a telofázu.

Mitotický index: pomer buniek v metafáze delený celkovým počtom buniek pozorovaných v populácii buniek; náznak stupňa proliferácie buniek tejto populácie.

Mutagénny: produkujúci dedičnú zmenu série(-í) bázových párov DNA v génoch alebo štruktúry chromozómov (chromozómové odchýlky).

▼**M3**

Nerozpojenie: chyba pri rozdeľovaní spárovaných chromatíd, ktorá spôsobí, že vznikajúce dcérske bunky sa riadne neoddelia, následkom čoho vznikajú dcérske bunky s abnormálnym počtom chromozómov.

Polyploidia: početné chromozómové odchýlky v bunkách alebo organizmoch, ktoré zahŕňajú celý(-é) súbor(-y) chromozómov na rozdiel od jednotlivého chromozómu alebo chromozómov (aneuploidia).

Proliferačný index (PI): metóda merania cytotoxicity, pri ktorej sa nepoužíva cytoB (pozri vzorec v dodatku 2).

Relatívne zvýšenie počtu buniek (RICC): metóda merania cytotoxicity, pri ktorej sa nepoužíva cytoB (pozri vzorec v dodatku 2).

Relatívne zdvojenie populácie (RPD): metóda merania cytotoxicity, pri ktorej sa nepoužíva cytoB (pozri vzorec v dodatku 2).

Index replikácie (RI): pomer cyklov delenia buniek, ktoré boli dokončené v ošetrenej kultúre, vo vzťahu k neošetrenej kontrole počas obdobia expozície a regenerácie (pozri vzorec v dodatku 2).

Testovaná chemikália (tiež sa nazýva testovaná látka): Akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

▼M3

Dodatok 2

Vzorce na hodnotenie cytotoxicity

1. *Pri použití cytoB* by hodnotenie cytotoxicity malo byť založené na proliferačnom indexe blokovania cytokinézy (CBPI) alebo na indexe replikácie (RI) (16) (58). CBPI naznačuje priemerný počet bunkových cyklov na bunku počas obdobia expozície cytoB a môže sa použiť na výpočet proliferácie buniek. RI indikuje relatívny počet jadier v ošetrených kultúrach v porovnaní s kontrolnými kultúrami a možno ho použiť na percentuálny výpočet cytostázy:

$$\text{Cytostáza } \% = 100 - 100\{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)\}$$

pričom:

T = kultúra ošetrená testovanou chemikáliou

C = kontrolná kultúra s nosičom,

kde:

$$\text{CBPI} = \frac{\begin{array}{c}((\text{počet jednojadrových buniek}) + \\ (2 \times \text{počet dvojjadrových buniek}) + (3 \times \text{počet viacjadrových buniek}))\end{array}}{(\text{celkový početbuniek})}$$

Preto ak CBPI je 1 (všetky bunky sú jednojadrové), rovná sa 100 % cytostáze.

Cytostáza = 100 – RI

$$\text{RI} = \frac{((\text{počet dvojjadrových buniek}) + (2 \times \text{počet viacjadrových buniek})) \div (\text{celkový počet buniek})_T}{((\text{počet dvojjadrových buniek}) + (2 \times \text{počet viacjadrových buniek})) \div (\text{celkový počet buniek})_C} \times 100$$

T = ošetrené kultúry

C = kontrolné kultúry.

2. Preto ak RI je 53 %, znamená to, že v porovnaní s počtom buniek, ktorých delením vznikli dvojjadrové a viacjadrové bunky v kontrolnej kultúre, len 53 % tohto počtu sa delilo v ošetrenej kultúre, t. j. cytostáza je 47 %.

3. *Bez použitia cytoB* sa odporúča hodnotenie cytotoxicity založené na relatívnom zvýšení počtu buniek (RICC) alebo na relatívnom zdvojení populácie (RPD) (58), pretože v obidvoch prípadoch sa zohľadňuje pomer populácie delených buniek.

$$\text{RICC} = \frac{(\text{zvýšenie počtu buniek v ošetrených kultúrach (konečné – počiatočnéé)})}{(\text{zvýšenie počtu buniek v kontrolných kultúrach (konečné – počiatočnéé))}} \times 100$$

$$\text{RPD} = \frac{(\text{počet zdvojených populácií v ošetrených kultúrach})}{(\text{počet zdvojených populácií v kontrolných kultúrach})} \times 100$$

▼**M3**

kde:

Zdvojenie populácie = [log (počet buniek po ošetrení ÷ počiatočný počet buniek)] ÷ log 2.

4. Preto 53 % RICC alebo RDP indikuje 47 % cytotoxicitu/cytostázu.

5. Pri použití indexu proliferácie (PI) môže byť cytotoxicita hodnotená pomocou počítania počtu klonov obsahujúcich jednu bunku (cl1), 2 bunky (cl2), 3 až 4 bunky (cl4) a 5 až 8 buniek (cl8)

$$PI = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

6. PI sa používa ako hodnotný a spoľahlivý parameter cytotoxicity aj pri bunkových líniách kultivovaných *in situ* bez použitia cytoB (25) (26) (27) (28).

▼**M3**

Dodatok 3

Referenčné chemikálie odporúčané na hodnotenie výkonnosti ([1])

Kategória	Chemikália	Číslo CAS	Číslo EC
1. Klastogény aktívne bez metabolickej aktivácie			
	cytozín arabinozid	147-94-4	205-705-9
	mitomycín C	50-07-7	200-008-6
2. Klastogény vyžadujúce metabolickú aktiváciu			
	benzo(a)pyrén	50-32-8	200-028-5
	cyklofosfamid	50-18-0	200-015-4
3. Aneugény			
	kolchicín	64-86-8	200-598-5
	vinblastín	143-67-9	205-606-0
4. Negatívne látky			
	di(2-etylhexyl)ftalát	117-81-7	204-211-0
	kyselina nalidixová	389-08-2	206-864-7
	pyrén	129-00-0	204-927-3
	chlorid sodný	7647-14-5	231-598-3

([1]) Referenčné chemikálie sú odporúčané chemikálie na použitie. Nahradiť alebo doplniť chemikálie do zoznamu referenčných chemikálií možno v prípade, ak je ich aktivita známa, ak indukujú mikrojadrá rovnakými mechanizmami pôsobenia a ak sa ukážu ako relevantné v porovnaní s chemikáliami, ktoré sa budú testovať postupom MNvit. Odôvodnenie by v závislosti od účelu mohlo zahŕňať validačnú štúdiu, ktorá zapája veľké množstvo látok alebo sa sústredí na užšie spektrum založené na štúdii chemickej triedy testovanej látky alebo mechanizmu poškodenia.

▼M3

B. 50. **SENZIBILIZÁCIA KOŽE: LOKÁLNA SKÚŠKA LYMFATICKÝCH UZLÍN: DA**

ÚVOD

1. Usmernenia Organizácie pre hospodársku spoluprácu a rozvoj (OECD) na testovanie chemikálií a testovacie metódy EÚ sa pravidelne revidujú vzhľadom na vedecký pokrok, zmeny regulačných potrieb a dobré životné podmienky zvierat. Prvá testovacia metóda (TM) (B.42) na stanovenie senzibilizácie kože u myší, tzv. lokálna skúška lymfatických uzlín (LLNA; usmernenie OECD na vykonávanie testov 429), bola zrevidovaná (1). Podrobnosti validácie LLNA a revízia prác v tejto oblasti boli uverejnené (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Pri LLNA sa na meranie proliferácie lymfocytov používa rádioizotopický tymidín alebo jód, a preto má táto skúška obmedzené použitie v tých prípadoch, kde je problematické získavanie, použitie alebo likvidácia rádioaktívnych látok. LLNA: DA (vyvinutá spoločnosťou Daicel Chemical Industries, Ltd.) je nerádioaktívnou modifikáciou LLNA, ktorá kvantifikuje obsah adenozín-trifosfátu (ATP) prostredníctvom bioluminiscencie, ktorá je ukazovateľom proliferácie lymfocytov. LLNA: Testovacia metóda DA bola validovaná a zrevidovaná a odporúča ju medzinárodný panel pre partnerské preskúmanie ako užitočnú metódu na identifikáciu chemikálií spôsobujúcich alebo nespôsobujúcich senzibilizáciu kože s určitými obmedzeniami (10) (11) (12) (13). Táto testovacia metóda je vytvorená na posúdenie potenciálu chemikálií (látok a zmesí) spôsobiť senzibilizáciu kože u zvierat. Metóda opísaná v kapitole B.6 tejto prílohy a usmernení OECD na vykonávanie testov 406 využíva testy s morčatami, konkrétne maximalizačný test morčiat a Buehlerov test (14). LLNA (kapitola B.42 tejto prílohy; usmernenie OECD na vykonávanie testov 429) a dve nerádioaktívne modifikácie LLNA: DA (kapitola B.50 tejto prílohy; usmernenie OECD na vykonávanie testov 442 A) a LLNA: BrdU-ELISA (kapitola B.51 tejto prílohy; usmernenie OECD na vykonávanie testov 442 B) poskytujú výhodu v porovnaní s testami na morčatách opísanými v kapitole B.6 a usmernení OECD na vykonávanie testov 406 (14), a to pokiaľ ide o obmedzenie a zdokonalenie využívania zvierat.

2. Podobne ako LLNA, LNNA: DA skúma indukčnú fázu senzibilizácie kože a poskytuje kvantitatívne údaje vhodné na posúdenie odozvy na dávku. Okrem toho schopnosť identifikovať látky spôsobujúce senzibilizáciu kože bez potreby používania rádioaktívneho značenia DNA znižuje potenciál expozície rádioaktivite pri práci a problémy v súvislosti s likvidáciou odpadu. To môže následne umožniť zvýšené využívanie myší na identifikáciu látok spôsobujúcich senzibilizáciu kože, čo by ďalej mohlo znížiť využívanie morčiat na testovanie potenciálu senzibilizácie kože (t. j. B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (14).

VYMEDZENIE POJMOV

3. Použité definície sú uvedené v dodatku 1.

ÚVODNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

4. LLNA: DA je upravenou metódou LLNA na identifikáciu potenciálu chemikálií spôsobiť senzibilizáciu kože, ktorá má určité obmedzenia. Neznamená to nevyhnutne, že vo všetkých prípadoch sa má použiť LLNA: DA namiesto testu LLNA alebo testov s morčatami (t. j. metóda B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (14), ale skôr to, že táto skúška je rovnako hodnotná a môže sa použiť ako alternatíva, v ktorej pozitívne a negatívne výsledky vo všeobecnosti nevyžadujú ďalšie potvrdenie (10) (11). Testovacie laboratórium by malo posúdiť všetky dostupné informácie o testovanej látke pred uskutočnením štúdie. Takéto informácie budú obsahovať identitu a chemickú štruktúru testovanej látky,

▼M3

jej fyzikálno-chemické vlastnosti, výsledky všetkých ostatných *in vitro* alebo *in vivo* testov toxicity s testovanou látkou a toxikologické údaje o štruktúrne príbuzných chemikáliách. Tieto informácie treba vziať do úvahy pri určovaní, či LLNA: DA je pre testovanú látku vhodná [vzhľadom na nezlučiteľnosť obmedzených druhov chemikálií s LLNA: DA (pozri odsek 5)], a ako pomoc pri výbere dávok.

5. LLNA: DA je metóda *in vivo*, a to znamená, že pri hodnotení aktivity alergickej kontaktnej senzibilizácie sa nevylučuje používanie zvierat. Má však potenciál obmedziť používanie zvierat na tento účel pri porovnaní s testami na morčatách (B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (14). Okrem toho LLNA: DA ponúka značné zjemnenie spôsobu, akým sa zvieratá používajú na testy alergickej kontaktnej senzibilizácie (znižuje bolesť a utrpenie zvierat), keďže na rozdiel od metódy B.6 a usmernenia OECD na vykonávanie testov 406 LLNA: DA nevyžaduje, aby sa vyvolali reakcie dermálnej hypersenzitivity. Napriek výhodám, ktoré má LLNA: DA v porovnaní s metódou B.6 a usmernením OECD na vykonávanie testov 406 (14), existujú určité obmedzenia, ktoré by si mohli vyžadovať použiť metódu B.6 alebo usmernenie OECD na vykonávanie testov 406 [napr. testovanie určitých kovov, falošné pozitívne zistenia s určitými kožnými dráždivými látkami (ako napríklad niektoré povrchovo aktívne látky) (6) (1 a kapitola B.42 tejto prílohy), rozpustnosť testovanej látky]. Okrem toho chemické triedy alebo látky, ktoré obsahujú potenciálne zmätočné funkčné skupiny (16), si tiež môžu vyžadovať použitie testov s morčatami [t. j. B.6, usmernenie OECD na vykonávanie testov 406 (14)]. Obmedzenia, ktoré boli identifikované pre LLNA (1 a kapitola B.42 tejto prílohy), sa odporúčajú aj pre LLNA: DA (10). Okrem toho použitie LLNA: DA nemusí byť vhodné na testovanie látok, ktoré ovplyvňujú úrovne ATP (napr. látky, ktoré fungujú ako inhibítory ATP), alebo látok, ktoré ovplyvňujú presné meranie vnútrobunkového ATP (napr. prítomnosť enzýmov spôsobujúcich degradáciu ATP, prítomnosť ATP v mimobunkovom priestore lymfatickej uzliny). Okrem takto identifikovaných obmedzení by sa LLNA: DA mala uplatňovať pri testovaní všetkých látok okrem prípadov, keď tieto látky majú vlastnosti, ktoré by mohli narušať presnosť LLNA: DA. Okrem toho by sa mala zvážiť možnosť hraničných pozitívnych výsledkov v prípade, keď sa dosiahnu hodnoty stimulačného indexu (SI) od 1,8 do 2,5 (pozri odseky 31 a 32). To je založené na validačnej databáze 44 látok s použitím SI ≥ 1,8 (pozri odsek 6), pre ktoré LLNA: DA správne identifikovala 32 látok spôsobujúcich senzibilizáciu podľa LLNA, ale nesprávne identifikovala tri z 12 látok nespôsobujúcich senzibilizáciu podľa LLNA s hodnotami SI od 1,8 do 2,5 (t. j. hraničný pozitívny výsledok) (10). Keďže sa však na stanovenie hodnôt SI a výpočet predpokladaných vlastností testu použil rovnaký súbor údajov, stanovené údaje môžu byť nadhodnotením skutočných prediktívnych vlastností.

PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

6. Základným princípom, na ktorom sa LLNA: DA zakladá, je, že senzibilizátory vyvolávajú proliferáciu lymfocytov v lymfatickej uzline v drénovanom mieste aplikácie testovanej látky. Táto proliferácia je úmerná dávke a účinnosti aplikovaného alergénu a poskytuje jednoduchý prostriedok na získanie kvantitatívneho merania senzibilizácie. Proliferácia sa meria porovnávaním priemeru proliferácie v každej pokusnej skupine s priemerom proliferácie v kontrolnej skupine, ktorej sa podáva nosič (VC). Určí sa pomer priemernej proliferácie v každej ošetrenej skupine a priemernej proliferácie v súbežnej kontrolnej skupine s nosičom, ktorý sa označuje ako stimulačný index (SI) a mal by mať hodnotu ≥ 1,8 pred ďalším prípadným vyhodnotením testovanej látky ako

▼M3

potenciálneho senzibilizátora kože. Uvedené metódy sú založené na meraní obsahu ATP pomocou bioluminiscencie (ktoré koreluje s počtom živých buniek) (17) na preukázanie proliferácie zvýšeného počtu buniek v drénovaných ušných lymfatických uzlinách (18) (19). Metóda bioluminiscencie využíva enzým luciferáza na katalýzu tvorby svetla z ATP a luciferínu podľa tejto reakcie:

$$ATP + luciferin + O_2 \xrightarrow{Luciferase} oxyluciferin + AMP + PP_i + CO_2 + svetlo$$

Intenzita vyžarovaného svetla priamo súvisí s koncentráciou ATP a meria sa pomocou luminometra. Skúška luciferínu – luciferázy je citlivá metóda kvantifikácie ATP, ktorá sa používa v mnohých rôznych aplikáciách (20).

OPIS SKÚŠKY

Výber druhov zvierat

7. Vybraným druhom pre tento test je myš. Validačné štúdie LLNA: DA sa vykonávali výlučne s myšami kmeňa CBA/J, ktorý sa preto považuje za preferovaný kmeň (12) (13). Použijú sa mladé dospelé negravidné samice myši, ktoré nikdy nevrhli mláďatá. Na začiatku štúdie by zvieratá mali byť vo veku 8 – 12 týždňov a rozdiel medzi hmotnosťami zvierat má byť minimálny a nemá byť vyšší ako 20 % priemernej hmotnosti. Alternatívne sa môžu použiť iné kmene a samce, ak sa na základe údajov dá uspokojivo dokázať, že neexistujú významné odlišnosti špecifické pre kmeň a/alebo pohlavie v odozve na LLNA: DA.

Podmienky umiestnenia a kŕmenia

8. Myši by sa mali umiestniť v skupinách (21), pokiaľ sa neposkytne primerané vedecké odôvodnenie ich umiestnenia jednotlivo. Teplota miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 ± 3 °C. Aj keď relatívna vlhkosť by mala byť aspoň 30 % a pokiaľ možno by nemala prevyšovať 70 % okrem obdobia počas čistenia miestnosti, cieľom je, aby relatívna vlhkosť dosahovala 50 % – 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody.

Príprava zvierat

9. Zvieratá sa vyberú náhodne a sú označené tak, aby sa umožnila jednotlivá identifikácia (ale nie formou ušných značiek), a držia sa v klietkach aspoň 5 dní pred začiatkom podávania dávok, aby sa aklimatizovali na laboratórne podmienky. Pred začatím ošetrenia sa všetky zvieratá vyšetria, aby sa zaistilo, že nemajú žiadne viditeľné kožné poranenia.

Príprava dávok

10. Chemikálie v tuhom skupenstve by sa pred podaním dávky do ucha myši mali rozpustiť alebo suspendovať v rozpúšťadlách alebo nosičoch, a ak je to vhodné, rozriediť. Kvapalné chemikálie možno podávať priamo alebo pred podaním rozriediť. V prípade nerozpustných chemikálií, ako napríklad tých, ktoré sa vo všeobecnosti používajú ako zdravotnícke pomôcky, by sa pred podaním dávky do ucha myši mala uskutočniť zvýšená extrakcia vo vhodnom rozpúšťadle, aby sa odhalili všetky extrahovateľné zložky, ktoré sa budú testovať. Testované látky sa pripravujú každý deň okrem prípadu, keď údaje o stabilite preukazujú prijateľnosť uskladnenia.

▼M3

Kontrola spoľahlivosti

11. Riadne vykonanie skúšky sa dokazuje pomocou chemikálií na pozitívne kontroly (PC), ktoré reagujú primeranou a reprodukovateľnou citlivosťou na senzibilizujúcu testovanú látku, pre ktorú je dobre charakterizovaná šírka odozvy. Odporúča sa zahrnúť súbežnú pozitívnu kontrolu, pretože to dokazuje kompetenciu laboratória úspešne vykonať každú skúšku a umožňuje posúdenie vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti a porovnateľnosti. Pozitívnu kontrolu v každej štúdii vyžadujú aj niektoré regulačné orgány, a preto by používatelia mali pred vykonaním LLNA: DA konzultovať s príslušnými orgánmi. Rutinné použitie súbežnej pozitívnej kontroly sa podporuje aj preto, aby sa predišlo potrebe ďalšieho testovania na zvieratách, s cieľom splniť také požiadavky, ktoré by mohli vyplynúť z použitia periodickej pozitívnej kontroly (pozri odsek 12). Pozitívna kontrola by mala spôsobiť pozitívnu odozvu na LLNA: DA pri úrovni expozície, pri ktorej sa očakáva nárast stimulačného indexu (SI) > 1,8 v porovnaní s negatívnou kontrolnou skupinou. Dávka chemickej látky na pozitívnu kontrolu by sa mala zvoliť tak, aby nespôsobila nadmerné podráždenie kože ani systémovú toxicitu a aby indukcia bola reprodukovateľná, ale nie nadmerná (napr. SI > 10 by bol nadmerný). Vhodnými chemikáliami na pozitívnu kontrolu sú 25 % 3-fenyl-2-hexylpropanál (číslo CAS 101-86-0) a 25 % eugenol (číslo CAS 97-53-0) v acetóne: olivový olej (4: 1, objemové percentá). Môžu sa vyskytnúť okolnosti, keď sa v riadne zdôvodnených prípadoch môžu použiť iné pozitívne kontroly, ktoré spĺňajú uvedené kritériá.

12. Hoci sa odporúča súbežná pozitívna kontrolná skupina, môžu sa vyskytnúť situácie, keď môže byť vhodné periodické testovanie (t. j. v intervaloch najviac 6 mesiacov) pozitívnych kontrol v prípade tých laboratórií, ktoré vykonávajú LLNA: DA pravidelne (t. j. LLNA: DA vykonávajú v priebehu jedného mesiaca aspoň raz) a ktoré majú zavedenú historickú databázu pozitívnych kontrol, ktorá preukazuje schopnosť laboratória dosahovať reprodukovateľné a presné výsledky s pozitívnymi kontrolami. Primeranú odbornosť s použitím LLNA: DA možno úspešne preukázať dosiahnutím konzistentných pozitívnych výsledkov s pozitívnou kontrolou najmenej v 10 nezávislých testoch uskutočnených v určitom primeranom období (t. j. v období kratšom ako jeden rok).

13. Súbežná pozitívna kontrolná skupina by sa mala zahrnúť vždy, keď dôjde k procedurálnej zmene v súvislosti s LLNA: DA (napr. k zmene vyškoleného personálu, zmene materiálov a/alebo reagentov používaných pri testovacej metóde, zmene nástrojov používaných pri testovacej metóde, zmene zdroja testovaných zvierat), a takéto zmeny je potrebné zaznamenať v laboratórnych správach. Je potrebné zvážiť vplyv týchto zmien na primeranosť predtým zriadenej historickej databázy pri určovaní potreby zriadenia novej historickej databázy na zaznamenávanie konzistentnosti výsledkov pozitívnej kontroly.

14. Výskumní pracovníci by si mali uvedomiť, že rozhodnutie vykonať štúdiu pozitívnych kontrol na periodickom základe namiesto súbežných pozitívnych kontrol môže mať následky na primeranosť a prijateľnosť výsledkov negatívnej štúdie získaných bez súbežnej pozitívnej kontroly počas intervalu medzi každou periodickou štúdiou pozitívnej kontroly. Ak sa dosiahne napríklad falošný negatívny výsledok v periodickej štúdii pozitívnej kontroly, negatívne výsledky získané s testovanou látkou v intervale medzi poslednou prijateľnou periodickou štúdiou pozitívnej kontroly a neprijateľnou periodickou štúdiou pozitívnej kontroly možno spochybniť. Dôsledky týchto výsledkov treba dôkladne zvážiť pri určovaní toho, či vykonať súbežné pozitívne kontroly alebo iba periodické pozitívne kontroly. Treba tiež zvážiť použitie menšieho počtu zvierat v súbežnej pozitívnej kontrolnej skupine, ak je to vedecky odôvodnené a ak laboratórium na základe konkrétnych laboratórnych historických údajov preukáže, že možno použiť menší počet myší (22).

▼M3

15. Aj keď by sa pozitívna kontrola mala testovať v nosiči, o ktorom je známe, že vyvoláva konzistentnú odozvu (napr. acetón: olivový olej v pomere 4: 1, objemové percentá), môžu sa vyskytnúť určité regulačné situácie, v ktorých bude potrebné vykonať aj testovanie v neštandardnom nosiči (klinicky/chemicky zodpovedajúcom roztoku) (23). Ak sa súbežná pozitívna kontrola testuje v odlišnom nosiči ako testovaná látka, potom treba do testu súbežnej pozitívnej kontroly zahrnúť samostatnú kontrolnú skupinu, ktorej sa podáva nosič.

16. V prípadoch hodnotenia látok, ktoré patria do konkrétnej chemickej triedy alebo ktoré zastupujú konkrétny rozsah odoziev, môžu byť tiež užitočné referenčné látky, aby sa preukázalo, že testovacia metóda na zisťovanie potenciálu týchto druhov látok spôsobiť senzibilizáciu kože riadne funguje. Vhodné referenčné látky majú mať tieto vlastnosti:

— štrukturálnu a funkčnú podobnosť s triedou testovanej látky, ktorá je predmetom testovania,

— známe fyzikálno-chemické vlastnosti,

— podporné údaje z LLNA: DA,

— podporné údaje z ďalších zvieracích a/alebo ľudských modelov.

TESTOVACÍ POSTUP

Počet zvierat a veľkosť dávky

17. Na dávkovú skupinu sa používajú aspoň štyri zvieratá, aspoň tri koncentrácie testovanej látky a k tomu súbežná negatívna kontrolná skupina, ktorej sa podáva iba nosič testovanej látky, a pozitívna kontrola (súbežná alebo nedávna, podľa laboratórnych pravidiel s prihliadnutím na odseky 11 – 15). Treba zvážiť testovanie viacerých dávok pozitívnej kontroly, najmä ak sa testuje na prerušovanej báze. So zvieratami v kontrolných skupinách by sa malo zaobchádzať rovnakým spôsobom ako s pokusnými zvieratami okrem prípadov, keď sa ošetrovanie testovanou látkou nevykonáva.

18. Výber dávky a nosiča by mal byť založený na odporúčaniach uvedených v odkazoch (2) a (24). Následné dávky sa zvyčajne vyberajú z vhodných sérií koncentrácií, napr. 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % atď. Výber zo sérií koncentrácií je potrebné primerane vedecky zdôvodniť. Všetky existujúce informácie o toxicite (napr. akútnej toxicite a podráždení kože), ako aj štrukturálne a fyzikálno-chemické informácie o predmetnej testovanej látke (a/alebo štrukturálne príbuzných látkach) by sa mali prípadne posúdiť výberom troch po sebe idúcich koncentrácií tak, aby najvyššia koncentrácia maximalizovala expozíciu, pričom by sa však zabránilo systémovej toxicite a/alebo nadmernému lokálnemu podráždeniu kože (24) (25). Ak tieto informácie nie sú k dispozícii, možno bude potrebné vykonať predbežný skríningový test (pozri odseky 21 – 24).

19. Nosič by nemal ovplyvňovať výsledok testu a mal by sa vybrať na základe maximálnej rozpustnosti s cieľom získať najvyššiu dosiahnuteľnú koncentráciu, pričom vznikne roztok/suspenzia vhodná na aplikáciu testovanej látky. Odporúčané nosiče sú acetón: olivový olej (4: 1, objemové percentá), *N,N*-dimetylformamid, metyletylketón, propylénglykol a dimetylsulfoxid (6), ale môžu sa použiť aj iné nosiče, ak sa uvedie uspokojivé vedecké zdôvodnenie. V určitých situáciách môže byť potrebné použiť ako ďalšiu kontrolu klinicky vhodný roztok alebo komerčný prípravok, v ktorom sa testovaná látka predáva. Osobitnú pozornosť je potrebné venovať zabezpečeniu, aby sa hydrofilné testované látky začlenili do systému nosiča, ktorý zvlhčuje pokožku, a rýchlo neunikli, a to začlenením vhodných rozpúšťadiel (napr. 1 % Pluronic® L92). Preto je potrebné vyhýbať sa použitiu čisto vodných nosičov.

▼M3

20. Spracovanie lymfatických uzlín jednotlivých myší umožňuje posúdiť variabilitu medzi zvieratami a štatisticky porovnať rozdiel medzi meraniami testovanej látky a kontrolnej skupiny, ktorej sa podáva nosič (pozri odsek 33). Okrem toho sa zníženie počtu myší v pozitívnej kontrolnej skupine môže prehodnotiť len po poskytnutí informácií o jednotlivých zvieratách (22). Navyše niektoré regulačné orgány požadujú zber údajov o jednotlivých zvieratách. Pravidelný zber údajov o jednotlivých zvieratách poskytuje výhodu, pokiaľ ide o dobré životné podmienky zvierat, pretože sa predchádza duplicitnému testovaniu, ktoré by bolo potrebné v prípade, ak by výsledky testovanej látky pôvodne získané jedným spôsobom (napr. prostredníctvom spojených údajov o zvieratách) museli neskôr posúdiť regulačné orgány podľa iných požiadaviek (napr. prostredníctvom údajov o jednotlivých zvieratách).

Predbežný skríningový test

21. V prípade, ak nie sú k dispozícii informácie na stanovenie najvyššej dávky testovanej látky (pozri odsek 18), treba vykonať predbežný skríningový test s cieľom stanoviť primeranú úroveň testovanej dávky na použitie v LLNA: DA. Cieľom predbežného skríningového testu je poskytnúť usmernenie na výber maximálnej úrovne dávky na použitie v hlavnej štúdii LLNA: DA v prípade, že nie sú dostupné informácie o koncentrácii, ktorá spôsobuje systémovú toxicitu (pozri odsek 24) a/alebo nadmerné lokálne podráždenie kože (pozri odsek 23). Maximálna úroveň testovanej dávky by mala obsahovať 100 % testovanej látky v prípade kvapalín alebo maximálnu možnú koncentráciu v prípade tuhých látok alebo suspenzií.

22. Predbežný skríningový test sa vykonáva za podmienok, ktoré sú identické s hlavnou štúdiou LLNA: DA s tým rozdielom, že sa neposudzuje proliferácia lymfatickej uzliny a môže sa použiť menší počet zvierat na dávkovú skupinu. Navrhuje sa jedno alebo dve zvieratá na dávkovú skupinu. U všetkých myší sa každý deň pozorujú klinické príznaky systémovej toxicity alebo lokálneho podráždenia v mieste aplikácie. Telesné hmotnosti zvierat sa zaznamenajú na začiatku testu a pred usmrtením (deň 8). Obidve uši každej myši sa vyšetria, či nemajú príznaky erytému (sčervenania kože), a vyhodnotia sa podľa tabuľky 1 (25). Hrúbka ucha sa odmeria pomocou meradla hrúbky (napr. digitálnym mikrometrom alebo meradlom hrúbky Peacock Dial) v deň 1 (pred aplikáciou dávky), v deň 3 (približne 48 hodín po prvej dávke), v deň 7 (24 hodín pred usmrtením) a v deň 8. Okrem toho možno hrúbku ucha v deň 8 určiť na základe meraní vážením vzoriek uší, ktoré by sa malo vykonať po humánnom usmrtení zvierat. Nadmerné lokálne podráždenie kože indikuje hodnotenie erytému $\geq$ 3 a/alebo zvýšenie hrúbky ucha o $\geq$ 25 % v ktorýkoľvek deň merania (26) (27). Najvyššia dávka vybraná pre hlavnú štúdiu LLNA: DA bude najbližšia nižšia dávka z predbežných skríningových sérií koncentrácií (pozri odsek 18), ktorá nespôsobuje systémovú toxicitu a/ani nadmerné lokálne podráždenie kože.

Tabuľka 1

Hodnotenia erytému

Pozorovanie	Hodnotenie
Žiadny erytém	0
Veľmi slabý erytém (sotva pozorovateľný)	1
Jasne ohraničený erytém	2

▼M3

Pozorovanie	Hodnotenie
Mierny až silný erytém	3
Výrazný erytém (tmavočervený) až vytvorenie chrasty zabraňujúcej posúdeniu erytému	4

23. Okrem 25 % zvýšenia hrúbky ucha (26) (27) sa štatisticky významné zvýšenie hrúbky ucha v testovanej skupine myší v porovnaní s kontrolnou skupinou myší použilo aj na identifikáciu dráždivých látok v LLNA (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34). Štatisticky významné zvýšenie hrúbky ucha môže nastať aj vtedy, keď dôjde k zvýšeniu menšiemu ako 25 %, nespája sa však konkrétne s nadmerným podráždením kože (30) (31) (32) (33) (34).

24. Nasledujúce klinické pozorovania môžu indikovať systémovú toxicitu (35), ak sú súčasťou integrovaného posudzovania, to znamená, že môžu indikovať maximálnu úroveň dávky na použitie v hlavnej štúdii LLNA: DA: zmeny funkcie nervového systému (napr. piloerekcia, ataxia, triaška a kŕče); zmeny správania (napr. agresia, zmena pri čistení, výrazná zmena stupňa aktivity); zmena dýchania (t. j. zmena frekvencie alebo intenzity dýchania, ako napríklad zadúšanie, dýchavičnosť a šelest) a zmeny spotreby potravy a vody. Okrem toho treba v hodnotení zvážiť príznaky letargie a/alebo apatie a akékoľvek klinické príznaky silnejšej alebo dlhodobejšej bolesti a utrpenia alebo viac ako 5 % zníženie telesnej hmotnosti medzi dňom 1 a 8 a úmrtnosť. Umierajúce zvieratá alebo zvieratá, ktoré majú zjavne silné bolesti alebo vykazujú príznaky silného utrpenia, by sa mali humánnym spôsobom usmrtiť (36).

Harmonogram pokusov v hlavnej štúdii

25. Harmonogram pokusov v rámci skúšky je takýto:

— Deň 1: Označte každé zviera a zaznamenajte jeho hmotnosť a akékoľvek klinické pozorovania. Aplikujte 1 % vodný roztok laurylsulfátu sodného (SLS) na zadnú stranu každého ucha štyrmi až piatimi ťahmi kefky namočenej v roztoku SLS tak, aby bola pokrytá celá zadná strana každého ucha. Hodinu po aplikácii SLS začnite s aplikáciou 25 µL z príslušného zriedenia testovanej látky, samotného nosiča alebo pozitívnej kontroly (súbežnej alebo nedávnej, podľa laboratórnych pravidiel s prihliadnutím na odseky 11 – 15) na zadnú stranu každého ucha.

— Dni 2, 3 a 7: Zopakujte predbežné ošetrenie 1 % vodným roztokom SLS a postup aplikácie testovanej látky vykonaný v prvom dni.

— Dni 4, 5 a 6: Žiadne ošetrenie.

— Deň 8: Zaznamenajte hmotnosť každého zvieraťa a akékoľvek klinické príznaky. Približne 24 až 30 hodín po začatí aplikácie v deň 7 sa zvieratá humánne usmrtia. Drénované ušné lymfatické uzliny sa odstránia z každého ucha myši a jednotlivo sa spracujú vo fosfátom tlmenom fyziologickom roztoku (PBS) pre každé zviera. Údaje a diagramy identifikácie a disekcie lymfatických uzlín možno nájsť v odkaze (22). Pri ďalšom monitorovaní lokálnej odozvy kože v hlavnej štúdii možno do protokolu štúdie zahrnúť ďalšie parametre, ako napríklad hodnotenie erytému ucha alebo merania hrúbky ucha (získané pomocou meradla hrúbky alebo vážením vzoriek uší pri pitve).

▼M3

Príprava bunkových suspenzií

26. Jednobunková suspenzia buniek lymfatických uzlín (LNC) odobraná bilaterálne z každej myši sa pripravuje tak, že lymfatické uzliny sa uložia medzi dve podložné sklíčka, ktoré sa mierne stlačia, aby sa uzliny rozdrvili. Presvedčte sa, že tkanivo je rovnomerne rozložené, a potom podložné sklíčka oddeľte. Rozpustite tkanivo na oboch sklíčkach vo fosfátom tlmenom fyziologickom roztoku; každé sklíčko držte v určitom uhle nad Petriho miskou a opláchnite roztokom PBS, pričom súbežne škrabkou na bunky odoberte tkanivo zo sklíčka. Navyše keďže lymfatické uzliny zvierat v negatívnej kontrole sú malé, dôležité je opatrné zaobchádzanie, aby sa predišlo umelým účinkom na hodnoty SI. Na opláchnutie obidvoch sklíčok by sa mal použiť celkový objem 1 ml roztoku PBS. Suspenzia buniek lymfatických uzlín v Petriho miske by sa mala mierne homogenizovať škrabkou na bunky. Následne sa zo suspenzie buniek lymfatických uzlín mikropipetou odoberie alikvotná časť 20 µl, pričom sa dbá na to, aby sa neodobrala okom viditeľná membrána, a táto alikvotná časť sa zmieša s 1,98 ml roztoku PBS tak, aby sa získali 2 ml vzorky. Druhá 2 ml vzorka sa potom pripraví rovnakým postupom, takže pre každé zviera sa pripravia dve vzorky.

Stanovenie proliferácie buniek (meranie obsahu ATP v lymfocytoch)

27. Zvýšenie obsahu ATP v lymfatických uzlinách sa meria metódou, ktorá využíva luciferín/luciferázu a súpravu na meranie ATP, ktorá meria bioluminiscenciu v jednotkách relatívnej luminiscencie (RLU). Čas skúšky od času usmrtenia zvieraťa po meranie obsahu ATP má byť jednotný u každého zvieraťa a má trvať približne 30 minút, pretože obsah ATP sa zrejme po usmrtení zvieraťa postupne znižuje (12). Preto by sa séria postupov od odobrania ušných lymfatických uzlín až po meranie ATP mala dokončiť do 20 minút podľa vopred určeného časového plánu, ktorý je rovnaký pre každé zviera. Luminiscencia ATP by sa mala merať v každej 2 ml vzorke tak, aby sa získali dva výsledky meraní ATP pre každé zviera. Následne sa určí priemerná luminiscencia ATP, ktorá sa použije v ďalších výpočtoch (pozri odsek 30).

POZOROVANIA

Klinické pozorovania

28. Každá myš sa starostlivo vyšetrí aspoň jedenkrát denne na všetky klinické príznaky, či už ide o lokálne podráždenie v mieste aplikácie, alebo o systémovú toxicitu. Všetky pozorovania sa systematicky zaznamenávajú, pričom každá myš má individuálny záznam. Plány na monitorovanie by mali zahŕňať kritériá na rýchlu identifikáciu tých myší, ktoré vykazujú systémovú toxicitu, nadmerné lokálne podráždenie alebo poleptanie kože a ktoré majú byť humánne usmrtené (36).

Telesné hmotnosti

29. Ako sa uvádza v odseku 25, telesné hmotnosti jednotlivých zvierat by sa mali odmerať na začiatku testu a pri naplánovanom usmrtení zvierat.

VÝPOČET VÝSLEDKOV

30. Výsledky v každej pokusnej skupine sa vyjadrujú ako priemerná hodnota stimulačného indexu (SI). SI sa získa vydelením priemernej hodnoty RLU/myš v rámci každej skupiny, ktorej sa podávala testovaná látka, a pozitívnej kontrolnej skupiny priemernou hodnotou RLU/myš v kontrolnej skupine, ktorej sa podávalo rozpúšťadlo/nosič. Priemerná hodnota SI kontrolných skupín, ktorým sa podával nosič, je potom 1.

▼M3

31. V rozhodovacom procese sa za pozitívny výsledok považuje stimulačný index ≥ 1,8 (10). Pri určovaní toho, či hraničný výsledok (t. j. hodnota SI v rozmedzí od 1,8 do 2,5) je pozitívny, sa však môže použiť aj sila vzťahu medzi dávkou a odozvou, štatistický význam a konzistentnosť rozpúšťadla/nosiča a odoziev pozitívnej kontroly (2) (3) (37).

32. Pri hraničnej pozitívnej odozve, keď sa SI pohybuje medzi 1,8 a 2,5, môžu používatelia na potvrdenie toho, že takéto výsledky sú pozitívne, zvážiť doplňujúce informácie, ako napríklad vzťah medzi dávkou a odozvou, dôkazy systémovej toxicity alebo nadmerného podráždenia a v prípade potreby štatistický význam spolu s hodnotami SI (10). Pozornosť by sa mala venovať aj rôznym vlastnostiam testovanej látky vrátane toho, či má štrukturálny vzťah k látkam, ktoré sú známymi senzibilizátormi kože, či spôsobuje nadmerné podráždenie kože myši, a vrátane charakteru pozorovanej odozvy na dávku. Tieto a ostatné hľadiská sa podrobne rozoberajú inde (4).

33. Zber údajov na úrovni jednotlivých myší umožní vykonať štatistickú analýzu prítomnosti a úrovne vzťahu medzi dávkou a odozvou v údajoch. Každé štatistické posúdenie by mohlo zahŕňať hodnotenie vzťahu medzi dávkou a odozvou, ako aj vhodne upravené porovnávania testovaných skupín (napr. porovnávania v pároch skupiny, ktorej sa podáva dávka, a súbežnej kontrolnej skupiny s rozpúšťadlom/nosičom). Štatistické analýzy môžu zahŕňať napr. lineárnu regresiu alebo Williamsov test na posúdenie trendov vo vzťahu medzi dávkou a odozvou a Dunnettov test na porovnávanie v pároch. Pri výbere vhodnej metódy štatistickej analýzy by si výskumný pracovník mal uvedomovať možné nerovnosti rozdielov a ďalšie súvisiace problémy, ktoré si môžu vyžadovať premenu údajov alebo štatistickú analýzu založenú na iných ako parametrických údajoch. Výskumný pracovník bude možno v každom prípade musieť vykonať výpočty SI a štatistické analýzy s určitými dátovými bodmi a bez nich (niekedy sa tieto údaje nazývajú „extrémne hodnoty“).

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

34. Údaje by sa mali zhrnúť vo forme tabuľky, v ktorej sa uvádzajú hodnoty RLU jednotlivých zvierat, skupinová priemerná hodnota RLU/zviera, súvisiaci rozsah chyby (napr. SD, SEM) a stredná hodnota SI pre každú dávkovú skupinu v porovnaní so súbežnou kontrolnou skupinou s rozpúšťadlom/nosičom.

Správa o teste

35. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testované a kontrolné chemické látky:

— identifikačné údaje (napr. čísla CAS, čísla EC, ak sú k dispozícii, zdroj, čistota, známe nečistoty, číslo šarže),

— fyzikálny charakter a fyzikálno-chemické vlastnosti (napr. prchavosť, stabilita, rozpustnosť),

— v prípade zmesi zloženie a relatívny percentuálny podiel zložiek.

Rozpúšťadlo/nosič:

— identifikačné údaje (čistota, v prípade potreby koncentrácia, použitý objem),

— zdôvodnenie voľby nosiča.

▼M3

Testovacie zvieratá:

— použitý kmeň myší CBA,

— mikrobiologický stav zvierat, ak je známy,

— počet a vek zvierat,

— zdroj zvierat, podmienky umiestnenia, krmivo atď.

Podmienky testu:

— zdroj, číslo šarže a kontrolné údaje výrobcu o kvalite/presnosti súpravy ATP,

— informácie o príprave a aplikácii testovanej látky,

— zdôvodnenie výberu dávky (vrátane výsledkov z predbežného skríningového testu, ak sa uskutočnil),

— použité koncentrácie nosiča a testovanej látky a celkové množstvo aplikovanej testovanej látky,

— údaje o kvalite krmiva a vody (vrátane druhu/zdroja krmiva, zdroja vody),

— podrobný opis harmonogramu podávania dávok a odberu vzoriek,

— metódy merania toxicity,

— kritériá na hodnotenie štúdií ako pozitívnych alebo negatívnych,

— informácie o akýchkoľvek odchýlkach od protokolu a vysvetlenie, ako odchýlky ovplyvňujú návrh a výsledky štúdie.

Kontrola spoľahlivosti:

— súhrn výsledkov poslednej kontroly spoľahlivosti vrátane informácií o testovanej látke, koncentrácii a použitom nosiči,

— súbežné a/alebo historické kontrolné údaje o pozitívnej a súbežnej negatívnej kontrole (s rozpúšťadlom/nosičom) pre testovacie laboratórium,

— ak nebola zahrnutá súbežná pozitívna kontrola, dátum a laboratórna správa o najaktuálnejšej periodickej pozitívnej kontrole a správa s historickými údajmi o pozitívnej kontrole, ktorými laboratórium zdôvodňuje nevykonanie súbežnej pozitívnej kontroly.

Výsledky:

— hmotnosti jednotlivých myší na začiatku podávania dávky a pri naplánovanom usmrtení, ako aj priemerný a súvisiaci rozsah chyby (napr. SD a SEM) pre každú pokusnú skupinu,

— časový priebeh nástupu príznakov toxicity u každého zvieraťa vrátane podráždenia kože v mieste podania látky, ak sa vyskytnú,

— čas usmrtenia zvieraťa a čas merania ATP u každého zvieraťa,

— tabuľka hodnôt RLU jednotlivých myší a hodnoty SI každej pokusnej skupiny s dávkou,

— priemerný a súvisiaci rozsah chyby (napr. SD, SEM) v súvislosti s hodnotami RLU/myš každej pokusnej skupiny a výsledky analýzy extrémnej hodnoty v každej pokusnej skupine,

▼M3

— výpočet SI a vhodné opatrenie variability, ktoré berie do úvahy variabilitu medzi zvieratami v skupinách, ktorým sa podáva testovaná látka, a v kontrolných skupinách,

— vzťah medzi dávkou a odozvou,

— v prípade potreby štatistické analýzy.

Rozbor výsledkov:

— stručný komentár v súvislosti s výsledkami, analýza odozvy na dávku, štatistické analýzy, ak existujú, s uvedením záveru, či by sa testovaná látka mala považovať za látku spôsobujúcu senzibilizáciu kože.

LITERATÚRA

1. Chamberlain, M. and Basketter, D. A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 999 – 1002.

2. OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

3. Basketter, D. A., Gerberick, G. F., Kimber, I. and Loveless, S. E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem, Toxicol.*, 34, 985 – 997.

4. Basketter, D. A., Gerberick, G. F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327 – 333.

5. Van Och, F. M. M., Slob, W., De Jong, W. H., Vandebriel, R. J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49 – 59.

6. ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No 99-4494. Research Triangle Park, N.C. K dispozícii na stránke: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf].

7. Dean, J. H., Twerdok, L. E., Tice, R. R., Sailstad, D. M., Hattan, D. G., Stokes, W. S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 258 – 273.

8. Haneke, K. E., Tice, R. R., Carson, B. L., Margolin, B. H., Stokes, W. S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. *Reg. Toxicol. Pharmacol. 34*, 274 – 286.

9. Sailstad, D. M., Hattan, D., Hill, R. N., Stokes, W. S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process.*Reg. Toxicol. Pharmacol.* 34, 249 – 257.

10. ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: modified by Daicel Chemical Industries, Ltd., based on ATP content test method protocol (LLNA: DA). NIH Publication No 10-7551A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozícii na stránke: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-DA/TMER.htm].

▼**M3**

11. ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozícii na stránke: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf].

12. Idehara, K., Yamagishi, G., Yamashita, K. and Ito, M. (2008), Characterization and evaluation of a modified local lymph node assay using ATP content as a non-radio isotopic endpoint.*J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 1 – 10.

13. Omori, T., Idehara, K., Kojima, H., Sozu, T., Arima, K., Goto, H., Hanada, T., Ikarashi, Y., Inoda, T., Kanazawa, Y., Kosaka, T., Maki, E., Morimoto, T., Shinoda, S., Shinoda, N., Takeyoshi, M., Tanaka, M., Uratani, M., Usami, M., Yamanaka, A., Yoneda, T., Yoshimura, I. and Yuasa, A. (2008), Interlaboratory validation of the modified murine local lymph node assay based on adenosine triphosphate measurement. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, 58, 11 – 26.

14. OECD (1992), *Skin Sensitisation*, Test Guideline No 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

15. Kreiling, R., Hollnagel, H. M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M. S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). *Food Chem. Toxicol.*, 46, 1896 – 1904.

16. Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrillo, J. C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 55, 90 – 96.

17. Crouch, S. P., Kozlowski, R., Slater, K. J. and Fletcher J. (1993), The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.*, 160, 81 – 88.

18. Ishizaka, A., Tono-oka, T. and Matsumoto, S. (1984), Evaluation of the proliferative response of lymphocytes by measurement of intracellular ATP. *J. Immunol. Meth.*, 72, 127 – 132.

19. Dexter, S. J., Cámara, M., Davies, M. and Shakesheff, K. M. (2003), Development of a bioluminescent ATP assay to quantify mammalian and bacterial cell number from a mixed population. *Biomat.*, 24, 27 – 34.

20. Lundin A. (2000), Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. *Meth. Enzymol.*, 305, 346 – 370.

21. ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

22. ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Science. K dispozícii na stránke: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf].

23. McGarry, H. F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. *Toxicol.*, 238, 71 – 89.

24. Kimber, I., Dearman, R. J., Scholes, E. W., and Basketter, D. A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicol.*, 93, 13 – 31.

25. OECD (2002), *Acute Dermal Irritation/Corrosion*, Test Guideline No 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

▼**M3**

26. Reeder, M. K., Broomhead, Y. L., DiDonato, L. and DeGeorge, G. L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. *Toxicologist*, 96, 235.

27. ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozícii na stránke: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

28. Hayes, B. B., Gerber, P. C., Griffey, S. S. and Meade, B. J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195 – 206.

29. Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H. C., Ruzicka, T., Ahr, H. J., Lehmann, P., and Vohr, V. W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83 – 94.

30. Woolhiser, M. R., Hayes, B. B., and Meade, B. J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. *Toxicol. Meth.*, 8, 245 – 256.

31. Hayes, B. B., and Meade, B. J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. *Drug Chem. Toxicol.*, 22, 491 – 506.

32. Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A. O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R., and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60 – 68.

33. Vohr, H. W., and Ahr, H. J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721 – 728.

34. Patterson, R. M., Noga, E., and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023 – 1028.

35. ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozícii na stránke: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

36. OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

37. Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R. J., Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Basketter, D. A., Lea, L., House, R. V., Ladies, G. S., Loveless, S. E. and Hastings, K. L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Healt.*, 53 563 – 579.

38. OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessmen.*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

▼**M3**

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: Miera zhody výsledkov testovacej metódy s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o opatrenie výkonnosti testovacej metódy a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často zamieňa s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy (38).

Referenčná látka: Látka spôsobujúca alebo nespôsobujúca senzibilizáciu, ktorá sa používa ako štandardná látka na porovnávanie s testovanou látkou. Referenčná látka by mala mať tieto vlastnosti: i) konzistentný(-é) a spoľahlivý(-é) zdroj(-e); ii) štrukturálnu a funkčnú podobnosť s triedou látok, ktoré sa budú testovať; iii) známe fyzikálno-chemické vlastnosti; iv) podporné údaje o známych účinkoch a v) známu potenciu v rozsahu želanej odozvy.

Falošný negatívny výsledok: Látka je testovanou metódou nesprávne identifikovaná ako negatívna alebo neaktívna, pričom v skutočnosti je pozitívna alebo aktívna.

Falošný pozitívny výsledok: Látka je testom nesprávne identifikovaná ako pozitívna alebo aktívna, pričom v skutočnosti je negatívna alebo neaktívna.

Nebezpečnosť: Potenciál škodlivého účinku na zdravie alebo životné prostredie. Škodlivý účinok sa prejavuje až pri dostatočnej hladine expozície.

Medzilaboratórna reprodukovateľnosť: Miera, do akej rôzne kvalifikované laboratóriá, ktoré používajú rovnaký protokol a testujú rovnaké testovacie látky, dokážu dosiahnuť kvalitatívne a kvantitatívne podobné výsledky. Medzilaboratórna reprodukovateľnosť sa určuje počas postupov pred validáciou a v rámci postupov validácie a znamená mieru, do akej možno test úspešne prenášať medzi laboratóriami. Takisto je známa ako reprodukovateľnosť medzi laboratóriami (38).

Vnútrolaboratórna reprodukovateľnosť: Určenie miery, do akej kvalifikovaní pracovníci v rámci jedného laboratória dokážu úspešne opakovať výsledky s použitím konkrétneho protokolu v rôznom čase. Takisto je známa ako reprodukovateľnosť v rámci laboratória (38).

Extrémna hodnota: Extrémna hodnota je pozorovanie, ktoré je značne odlišné od ostatných hodnôt v náhodnej vzorke z populácie.

Zabezpečovanie kvality: Riadiaci proces, v ktorom jednotlivci nezávislí od osôb vykonávajúcich testy posudzujú súlad s laboratórnymi testovacími normami, požiadavkami a postupmi vedenia záznamov, ako aj presnosť prenosu údajov.

Spoľahlivosť: Meria rozsah, v rámci ktorého sa môže testovacia metóda počas istého časového obdobia opakovane vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Posudzuje sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti (38).

Senzibilizácia kože: Imunologický proces, ku ktorému dochádza po lokálnom vystavení náchylného jednotlivca chemickému alergénu, ktorý vyvoláva kožnú imunitnú reakciu, ktorá môže viesť k vytvoreniu kontaktnej senzibilizácie.

Stimulačný index (SI): Hodnota vypočítaná na posúdenie potenciálu testovanej látky spôsobiť senzibilizáciu kože; ide teda o pomer proliferácie v pokusných skupinách a proliferácie v súbežných kontrolných skupinách, ktorým sa podáva nosič.

Testovaná látka (tiež sa nazýva testovaná chemikália): Akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

▼M3

B. 51. **SENZIBILIZÁCIA KOŽE: LOKÁLNA SKÚŠKA LYMFATICKÝCH UZLÍN: BRDU-ELISA**

ÚVOD

1. Usmernenia Organizácie pre hospodársku spoluprácu a rozvoj (OECD) na testovanie chemikálií a testovacie metódy EÚ sa pravidelne revidujú vzhľadom na vedecký pokrok, zmeny regulačných potrieb a dobré životné podmienky zvierat. Prvá testovacia metóda (TM) (B.42) na stanovenie senzibilizácie kože u myší, tzv. lokálna skúška lymfatických uzlín (LLNA; usmernenie OECD na vykonávanie testov 429) bola zrevidovaná (1 a kapitola B.42 v tejto prílohe). Podrobnosti validácie LLNA a revízia prác v tejto oblasti boli uverejnené (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Pri LLNA sa na meranie proliferácie lymfocytov používa rádioizotopický tymidín alebo jód, a preto má táto skúška obmedzené použitie v tých prípadoch, kde je problematické získavanie, použitie alebo likvidácia rádioaktívnych látok. LLNA: BrdU-ELISA [enzýmová imunoskúška] je nerádioaktívna modifikácia testovacej metódy LLNA, ktorá na meranie proliferácie lymfocytov využíva 5-bróm-2-deoxyuridín (BrdU) (číslo CAS 59-14-3) v systéme testovania založenom na ELISA. LLNA: BrdU-ELISA bola validovaná a zrevidovaná a odporúča ju medzinárodný nezávislý vedecký panel pre partnerské preskúmanie ako užitočnú metódu na identifikáciu chemikálií spôsobujúcich alebo nespôsobujúcich senzibilizáciu kože s určitými obmedzeniami (10) (11) (12). Táto testovacia metóda je vytvorená na posúdenie potenciálu chemikálií (látok a zmesí) spôsobiť senzibilizáciu kože u zvierat. Metóda opísaná v kapitole B.6 tejto prílohy a usmernení OECD na vykonávanie testov 406 využíva testy s morčatami, a to maximalizačný test morčiat a Buehlerov test (13). LLNA (kapitola B.42 tejto prílohy; usmernenie OECD na vykonávanie testov 429) a dve nerádioaktívne modifikácie LLNA: BrdU-ELISA (kapitola B.51 tejto prílohy; usmernenie OECD na vykonávanie testov 442 B) a LLNA: DA (kapitola B.50 tejto prílohy; usmernenie OECD na vykonávanie testov 442 A) poskytujú výhodu v porovnaní s testami na morčatách opísanými v kapitole B.6 a usmernení OECD na vykonávanie testov 406 (13), a to pokiaľ ide o obmedzenie a zdokonalenie využívania zvierat.

2. Podobne ako LLNA, LNNA: BrdU-ELISA skúma indukčnú fázu senzibilizácie kože a poskytuje kvantitatívne údaje vhodné na posúdenie odozvy na dávku. Okrem toho schopnosť identifikovať látky spôsobujúce senzibilizáciu kože bez potreby používania rádioaktívneho značenia DNA znižuje potenciál expozície rádioaktivite pri práci a problémy v súvislosti s likvidáciou odpadu. To môže následne umožniť zvýšené využívanie myší na identifikáciu látok spôsobujúcich senzibilizáciu kože, čo by ďalej mohlo znížiť využívanie morčiat na testovanie potenciálu senzibilizácie kože (t. j. B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (13).

VYMEDZENIE POJMOV

3. Použité definície sú uvedené v dodatku 1.

ÚVODNÉ ÚVAHY A OBMEDZENIA

4. LLNA: BrdU-ELISA je upravená metóda LLNA na identifikáciu potenciálu chemikálií spôsobiť senzibilizáciu kože, ktorá má určité obmedzenia. Neznamená to nevyhnutne, že vo všetkých prípadoch sa má použiť LLNA: BrdU-ELISA namiesto testu LLNA alebo testov s morčatami (t. j. metóda B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (13), ale skôr to, že táto skúška je rovnako hodnotná a môže sa použiť ako alternatíva, v ktorej pozitívne a negatívne výsledky vo všeobecnosti nevyžadujú ďalšie potvrdenie. Testovacie laboratórium by malo posúdiť všetky dostupné informácie o testovanej látke pred uskutočnením štúdie. Takéto informácie

▼M3

budú obsahovať identitu a chemickú štruktúru testovanej látky, jej fyzikálno-chemické vlastnosti, výsledky všetkých ostatných *in vitro* alebo *in vivo* testov toxicity s testovanou látkou a toxikologické údaje o štruktúrne príbuzných chemikáliách. Tieto informácie treba vziať do úvahy pri určovaní, či LLNA: BrdU-ELISA je pre testovanú látku vhodná [vzhľadom na nezlučiteľnosť obmedzených druhov chemikálií s LLNA: BrdU-ELISA (pozri odsek 5)] a ako pomoc pri výbere dávok.

5. LLNA: BrdU-ELISA je metóda *in vivo*, a to znamená, že pri posudzovaní aktivity alergickej kontaktnej senzibilizácie sa nevylučuje používanie zvierat. Má však potenciál obmedziť používanie zvierat na tento účel pri porovnaní s testami na morčatách (B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (13). Okrem toho LLNA: BrdU-ELISA ponúka značné zjemnenie spôsobu, akým sa zvieratá používajú na testy alergickej kontaktnej senzibilizácie, keďže na rozdiel od metódy B.6 a usmernenia OECD na vykonávanie testov 406 LLNA: BrdU-ELISA nevyžaduje, aby sa vyvolali reakcie dermálnej hypersenzitivity. Okrem toho LLNA: BrdU-ELISA nevyžaduje použitie adjuvansu ako v prípade maximalizačného testu morčiat (kapitola B.6 tejto prílohy, 13). Testovacia metóda LLNA: BrdU-ELISA tak znižuje utrpenie zvierat. Napriek výhodám, ktoré LLNA: BrdU-ELISA má v porovnaní s metódou B.6 a usmernením OECD na vykonávanie testov 406 (13), existujú určité obmedzenia, pre ktoré možno bude potrebné používať B.6 alebo usmernenie OECD na vykonávanie testov 406 [napr. testovanie určitých kovov, falošné pozitívne zistenia s určitými kožnými dráždivými látkami (ako napríklad niektoré povrchovo aktívne látky) (6) (1 a kapitola B.42 tejto prílohy) alebo rozpustnosť testovanej látky]. Okrem toho chemické triedy alebo látky, ktoré obsahujú potenciálne zmätočné funkčné skupiny (15), si tiež môžu vyžadovať použitie testov s morčatami (t. j. B.6; usmernenie OECD na vykonávanie testov 406) (13). Obmedzenia, ktoré boli identifikované pre LLNA (1 a kapitola B.42 tejto prílohy), sa odporúčajú aj pre LLNA: BrdU-ELISA (10). Okrem takto identifikovaných obmedzení by sa LLNA: BrdU-ELISA mala uplatňovať pri testovaní akýchkoľvek chemikálií okrem prípadu, keď tieto chemikálie majú vlastnosti, ktoré by mohli narúšať presnosť LLNA: BrdU-ELISA. Okrem toho by sa mala zvážiť možnosť hraničných pozitívnych výsledkov v prípade, že sa dosiahnu hodnoty stimulačného indexu (SI) od 1,6 do 1,9 (pozri odseky 31 a 32). To je založené na validačnej databáze 43 látok s použitím SI $\geq$ 1,6 (pozri odsek 6), pre ktoré LLNA: BrdU-ELISA správne identifikovala všetkých 32 látok spôsobujúcich senzibilizáciu podľa LLNA, ale nesprávne identifikovala dve z 11 látok nespôsobujúcich senzibilizáciu podľa LLNA s hodnotami SI od 1,6 do 1,9 (t. j. hraničný pozitívny výsledok) (10). Keďže sa však na stanovenie hodnôt SI a výpočet predpokladaných vlastností testu použil rovnaký súbor údajov, stanovené údaje môžu byť nadhodnotením skutočných prediktívnych vlastností.

PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

6. Základným princípom, na ktorom sa LLNA: BrdU-ELISA zakladá, je, že senzibilizátory vyvolávajú proliferáciu lymfocytov v lymfatickej uzline v drénovanom mieste aplikácie testovanej látky. Táto proliferácia je úmerná dávke a účinnosti aplikovaného alergénu a poskytuje jednoduchý prostriedok na získanie kvantitatívneho merania senzibilizácie. Proliferácia sa meria porovnávaním priemernej proliferácie v každej pokusnej skupine s priemernou proliferáciou v kontrolnej skupine, ktorej sa podáva nosič. Určí sa pomer priemernej proliferácie v každej ošetrenej skupine a priemernej proliferácie v súbežnej kontrolnej skupine s nosičom, ktorý sa označuje ako stimulačný index (SI), a mal by mať hodnotu $\geq$ 1,6 pred ďalším prípadným vyhodnotením testovanej látky ako potenciálneho

▼M3

senzibilizátora kože. Uvedené metódy sú založené na meraní obsahu BrdU na preukázanie proliferácie zvýšeného počtu buniek v drénovaných ušných lymfatických uzlinách. BrdU je podobný tymidínu a je podobne začlenený do DNA proliferujúcich buniek. Začlenenie BrdU sa meria metódou ELISA, ktorá využíva peroxidázou označenú protilátku špecifickú pre BrdU. Peroxidáza po pridaní substrátu reaguje so substrátom produkujúcim sfarbený produkt, ktorý sa kvantifikuje pri konkrétnej absorbancii na mikrotitračnej platničke.

OPIS SKÚŠKY

Výber druhov zvierat

7. Vybraným druhom pre tento test je myš. Validačné štúdie LLNA: BrdU-ELISA sa vykonávali výlučne s myšami kmeňa CBA/JN, ktorý sa preto považuje za preferovaný kmeň (10) (12). Použijú sa mladé dospelé negravidné samice myši, ktoré nikdy nevrhli mláďatá. Na začiatku štúdie by zvieratá mali byť vo veku 8 – 12 týždňov a rozdiel medzi hmotnosťami zvierat má byť minimálny a nemá byť vyšší ako 20 % priemernej hmotnosti. Alternatívne sa môžu použiť iné kmene a samce, ak sa na základe údajov dá uspokojivo dokázať, že neexistujú významné odlišnosti špecifické pre kmeň a/alebo pohlavie v odozve na LLNA: BrdU-ELISA.

Podmienky umiestnenia a kŕmenia

8. Myši by sa mali umiestniť v skupinách (16) okrem prípadu, ak sa poskytne primerané vedecké odôvodnenie ich umiestnenia jednotlivo. Teplota miestnosti pre pokusné zvieratá by mala byť 22 ± 3 °C. Aj keď by relatívna vlhkosť mala byť aspoň 30 % a pokiaľ možno by nemala prevyšovať 70 % okrem obdobia počas čistenia miestnosti, cieľom je, aby relatívna vlhkosť dosahovala 50 % – 60 %. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy. Na kŕmenie sa môže používať bežné laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou pitnej vody.

Príprava zvierat

9. Zvieratá sa vyberú náhodne a sú označené tak, aby sa umožnila jednotlivá identifikácia (ale nie formou ušných značiek), a držia sa v klietkach aspoň 5 dní pred začiatkom podávania dávok, aby sa aklimatizovali na laboratórne podmienky. Pred začatím ošetrenia sa všetky zvieratá vyšetria, aby sa zaistilo, že nemajú žiadne viditeľné kožné poranenia.

Príprava dávok

10. Chemikálie v tuhom skupenstve by sa pred podaním dávky do ucha myši mali rozpustiť alebo suspendovať v rozpúšťadlách alebo nosičoch, a ak je to vhodné, rozriediť. Kvapalné chemikálie možno podávať priamo alebo pred podaním rozriediť. V prípade nerozpustných chemikálií, ako napríklad tých, ktoré sa vo všeobecnosti používajú ako zdravotnícke pomôcky, by sa pred podaním dávky do ucha myši mala uskutočniť zvýšená extrakcia vo vhodnom rozpúšťadle, aby sa odhalili všetky extrahovateľné zložky, ktoré sa budú testovať. Testované látky sa pripravujú každý deň okrem prípadu, keď údaje o stabilite preukazujú prijateľnosť uskladnenia.

Kontrola spoľahlivosti

11. Riadne vykonanie skúšky sa dokazuje pomocou pozitívnych kontrolných chemikálií, ktoré reagujú primeranou a reprodukovateľnou citlivosťou ako senzibilizujúce testované látky, pre ktoré je dobre charakterizovaná šírka odozvy. Odporúča sa zahrnúť súbežnú pozitívnu kontrolu, pretože to dokazuje kompetenciu laboratória úspešne vykonať každú skúšku a umožňuje posúdenie vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti a porovnateľnosti. Pozitívnu kontrolu v každej štúdii vyžadujú aj niektoré

▼M3

regulačné orgány, a preto by používatelia mali pred vykonaním LLNA: BrdU-ELISA konzultovať s príslušnými orgánmi. Rutinné použitie súbežnej pozitívnej kontroly sa podporuje aj preto, aby sa predišlo potrebe ďalšieho testovania na zvieratách s cieľom splniť také požiadavky, ktoré by mohli vzniknúť z použitia periodickej pozitívnej kontroly (pozri odsek 12). Pozitívna kontrola by mala spôsobiť pozitívnu odozvu na LLNA: BrdU-ELISA pri úrovni expozície, pri ktorej sa očakáva nárast stimulačného indexu (SI) > 1,6 v porovnaní s negatívnou kontrolnou (NC) skupinou. Dávka chemickej látky na pozitívnu kontrolu by sa mala zvoliť tak, aby nespôsobila nadmerné podráždenie kože ani systémovú toxicitu a aby indukcia bola reprodukovateľná, ale nie nadmerná (napr. SI > 14 by bol nadmerný). Vhodnými chemikáliami na pozitívnu kontrolu sú: 25 % 3-fenyl-2-hexylpropanál (číslo CAS 101-86-0) a 25 % eugenol (číslo CAS 97-53-0) v acetóne: olivový olej (4: 1, objemové percentá). Môžu sa vyskytnúť okolnosti, keď sa v riadne zdôvodnených prípadoch môžu použiť iné pozitívne kontroly, ktoré spĺňajú uvedené kritériá.

12. Hoci sa odporúča zahrnutie súbežnej pozitívnej kontrolnej skupiny, môžu sa vyskytnúť situácie, keď periodické testovanie (v intervaloch ≤ 6 mesiacov) s pozitívnou kontrolou môže byť vhodné v prípade tých laboratórií, ktoré vykonávajú LLNA: BrdU-ELISA pravidelne (t. j. vykonávajú LLNA: BrdU-ELISA v priebehu jedného mesiaca aspoň raz) a ktoré majú zavedenú historickú databázu pozitívnych kontrol, ktorá preukazuje schopnosť laboratória dosahovať reprodukovateľné a presné výsledky v pozitívnych kontrolách. BrdU-ELISA možno úspešne preukázať dosiahnutím konzistentných pozitívnych výsledkov v pozitívnej kontrole najmenej v 10 nezávislých testoch uskutočnených v určitom primeranom období (t. j. v období kratšom ako jeden rok).

13. Súbežná pozitívna kontrolná skupina sa má zahrnúť vždy, keď dôjde k procedurálnej zmene v súvislosti s LLNA: BrdU-ELISA (napr. k zmene vyškoleného personálu, zmene materiálov a/alebo reagentov používaných pri testovacej metóde, zmene nástrojov používaných pri testovacej metóde alebo zmene zdroja testovaných zvierat), a takéto zmeny je potrebné zaznamenať v laboratórnych správach. Je potrebné zvážiť vplyv týchto zmien na primeranosť predtým zriadenej historickej databázy pri určovaní potreby zriadenia novej historickej databázy na zaznamenávanie konzistentnosti výsledkov pozitívnej kontroly.

14. Výskumní pracovníci by si mali uvedomiť, že rozhodnutie vykonať štúdiu pozitívnych kontrol na periodickom základe namiesto súbežných pozitívnych kontrol môže mať následky na primeranosť a prijateľnosť výsledkov negatívnej štúdie získaných bez súbežnej pozitívnej kontroly počas intervalu medzi každou periodickou štúdiou pozitívnej kontroly. Ak sa dosiahne napríklad falošný negatívny výsledok v periodickej štúdii pozitívnej kontroly, negatívne výsledky získané s testovanou látkou v intervale medzi poslednou prijateľnou periodickou štúdiou pozitívnej kontroly a neprijateľnou periodickou štúdiou pozitívnej kontroly možno spochybniť. Dôsledky týchto výsledkov treba dôkladne zvážiť pri určovaní toho, či vykonať súbežné pozitívne kontroly, alebo iba periodické pozitívne kontroly. Treba tiež zvážiť použitie menšieho počtu zvierat v súbežnej pozitívnej kontrolnej skupine, ak je to vedecky odôvodnené a ak laboratórium na základe konkrétnych laboratórnych historických údajov preukáže, že možno použiť menší počet myší (17).

15. Aj keď by sa pozitívna kontrola mala testovať v nosiči, o ktorom je známe, že vyvoláva konzistentnú odozvu (napr. acetón: olivový olej v pomere 4: 1, objemové percentá), môžu sa vyskytnúť určité regulačné situácie, v ktorých bude potrebné vykonať aj testovanie v neštandardnom nosiči (klinicky/chemicky zodpovedajúcom roztoku) (18). Ak sa súbežná pozitívna kontrola testuje v odlišnom nosiči ako testovaná látka, potom treba do testu súbežnej pozitívnej kontroly zahrnúť samostatnú kontrolnú skupinu, ktorej sa podáva nosič.

▼M3

16. V prípadoch hodnotenia testovaných látok, ktoré patria do konkrétnej chemickej triedy, alebo rozsahu odoziev môžu byť užitočné aj referenčné látky, aby sa preukázalo, že testovacia metóda na zisťovanie potenciálu týchto druhov testovaných látok spôsobiť senzibilizáciu kože funguje riadne. Vhodné referenčné látky majú mať tieto vlastnosti:

— štrukturálnu a funkčnú podobnosť s triedou testovanej látky, ktorá je predmetom testovania,

— známe fyzikálno-chemické vlastnosti,

— podporné údaje z LLNA: BrdU-ELISA,

— podporné údaje z ďalších zvieracích a/alebo ľudských modelov.

TESTOVACÍ POSTUP

Počet zvierat a veľkosť dávky

17. Na dávkovú skupinu sa používajú aspoň štyri zvieratá, aspoň tri koncentrácie testovanej látky a k tomu súbežná negatívna kontrolná skupina, ktorej sa podáva iba nosič pre testovanú látku, a pozitívna kontrolná skupina (súbežná alebo súčasná, podľa laboratórnych pravidiel v súvisiacich odsekoch 11 – 15). Treba zvážiť testovanie viacerých dávok pozitívnej kontroly, najmä ak sa testuje na prerušovanej báze. So zvieratami v kontrolných skupinách by sa malo zaobchádzať rovnakým spôsobom ako s pokusnými zvieratami okrem prípadov, keď sa ošetrovanie testovanou látkou nevykonáva.

18. Výber dávky a nosiča by mal byť založený na odporúčaniach uvedených v odkazoch 2 a 19. Následné dávky sa zvyčajne vyberajú z vhodných sérií koncentrácií, napr. 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % atď. Výber zo sérií koncentrácií je potrebné primerane vedecky zdôvodniť. Všetky existujúce informácie o toxicite (napr. akútna toxicita a podráždenie kože), ako aj štrukturálne a fyzikálno-chemické informácie o testovanej látke, ktorá je predmetom záujmu (a/alebo štrukturálne príbuzných látkach), ak sú k dispozícii, by sa mali posúdiť výberom troch po sebe idúcich koncentrácií tak, aby najvyššia koncentrácia maximalizovala expozíciu, pričom by sa však zabránilo systémovej toxicite a/alebo nadmernému lokálnemu podráždeniu kože (19) (20 a kapitola B.4 tejto prílohy). Ak tieto informácie nie sú k dispozícii, možno bude potrebné vykonať predbežný skríningový test (pozri odseky 21 – 24).

19. Nosič by nemal ovplyvňovať výsledok testu a mal by sa vybrať na základe maximálnej rozpustnosti s cieľom získať najvyššiu dosiahnuteľnú koncentráciu, pričom vznikne roztok/suspenzia vhodná na aplikáciu testovanej látky. Odporúčané nosiče sú: acetón: olivový olej (4: 1, objemové percentá), *N,N*-dimetylformamid, metyletylketón, propylénglykol a dimetylsulfoxid (6), ale môžu sa použiť aj iné, ak sa uvedie uspokojivé vedecké zdôvodnenie. V určitých situáciách môže byť potrebné použiť ako ďalšiu kontrolu klinicky vhodný roztok alebo komerčný prípravok, v ktorom sa testovaná látka predáva. Osobitnú pozornosť je potrebné venovať zabezpečeniu toho, aby sa hydrofilné testované látky začlenili do systému nosiča, ktorý zvlhčuje pokožku, a rýchlo neunikli, a to začlenením vhodných rozpúšťadiel (napr. 1 % Pluronic® L92). Preto je potrebné vyhýbať sa použitiu čisto vodných nosičov.

▼M3

20. Spracovanie lymfatických uzlín jednotlivých myší umožňuje posúdiť variabilitu medzi zvieratami a štatisticky porovnať rozdiel medzi meraniami testovanej látky a kontrolnej skupiny, ktorej sa podáva nosič (pozri odsek 33). Okrem toho sa zníženie počtu myší v pozitívnej kontrolnej skupine môže prehodnotiť len po poskytnutí informácií o jednotlivých zvieratách (17). Navyše niektoré regulačné orgány požadujú zber údajov o jednotlivých zvieratách. Pravidelný zber údajov o jednotlivých zvieratách poskytuje výhodu, pokiaľ ide o dobré životné podmienky zvierat, pretože sa predchádza duplicitnému testovaniu, ktoré by bolo potrebné v prípade, ak by výsledky testovanej látky pôvodne získané jedným spôsobom (napr. prostredníctvom spojených údajov o zvieratách) museli neskôr posúdiť regulačné orgány podľa iných požiadaviek (napr. prostredníctvom údajov o jednotlivých zvieratách).

Predbežný skríningový test

21. V prípade, ak nie sú k dispozícii informácie na stanovenie najvyššej dávky testovanej látky (pozri odsek 18), treba vykonať predbežný skríningový test s cieľom stanoviť primeranú úroveň testovanej dávky na použitie v LLNA: BrdU-ELISA. Cieľom predbežného skríningového testu je poskytnúť usmernenie na výber maximálnej úrovne dávky na použitie v hlavnej štúdii LLNA: BrdU-ELISA v prípade, že nie sú dostupné informácie o koncentrácii, ktorá spôsobuje systémovú toxicitu (pozri odsek 24) a/alebo nadmerné lokálne podráždenie kože (pozri odsek 23). Maximálna úroveň testovanej dávky by mala obsahovať 100 % testovanej látky v prípade kvapalín alebo maximálnu možnú koncentráciu v prípade tuhých látok alebo suspenzií.

22. Predbežný skríningový test sa vykonáva za podmienok, ktoré sú identické s hlavnou štúdiou LLNA: BrdU-ELISA, s tým rozdielom, že sa neposudzuje proliferácia lymfatickej uzliny a môže sa použiť menší počet zvierat na dávkovú skupinu. Navrhuje sa jedno alebo dve zvieratá na dávkovú skupinu. U všetkých myší sa každý deň pozorujú klinické príznaky systémovej toxicity alebo lokálneho podráždenia v mieste aplikácie. Telesné hmotnosti zvierat sa zaznamenajú na začiatku testu a pred usmrtením (deň 6). Obidve uši myší sa vyšetria, či nemajú príznaky erytému (sčervenania kože), a vyhodnotia sa podľa tabuľky 1 (20 a kapitola B.4 tejto prílohy). Hrúbka ucha sa meria pomocou meradla hrúbky (napr. digitálnym mikrometrom alebo meradlom hrúbky Peacock Dial) v deň 1 (pred aplikáciou dávky), v deň 3 (približne 48 hodín po prvej dávke) a v deň 6. Okrem toho možno hrúbku ucha v deň 6 určiť na základe meraní vážením vzoriek uší, ktoré by sa malo vykonať po humánnom usmrtení zvierat. Nadmerné lokálne podráždenie kože indikuje hodnotenie erytému $\geq$ 3 a/alebo zvýšenie hrúbky ucha o $\geq$ 25 % v ktorýkoľvek deň merania (21) (22). Najvyššia dávka vybraná pre hlavnú štúdiu LLNA: BrdU-ELISA bude najbližšia nižšia dávka z predbežných skríningových sérií koncentrácií (pozri odsek 18), ktorá nespôsobuje systémovú toxicitu a/ani nadmerné lokálne podráždenie kože.

Tabuľka 1

Hodnotenia erytému

Pozorovanie	Hodnotenie
Žiadny erytém	0
Veľmi slabý erytém (sotva pozorovateľný)	1
Jasne ohraničený erytém	2

▼M3

Pozorovanie	Hodnotenie
Mierny až silný erytém	3
Výrazný erytém (tmavočervený) až vytvorenie chrasty zabraňujúcej posúdeniu erytému	4

23. Okrem 25 % zvýšenia hrúbky ucha (21) (22) sa štatisticky významné zvýšenie hrúbky ucha v testovanej skupine myší v porovnaní s kontrolnou skupinou myší tiež použilo na identifikáciu dráždivých látok v skúške LLNA (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28). Kým štatisticky významné zvýšenia môžu nastať, aj keď dôjde k zvýšeniu hrúbky ucha menšiemu ako 25 %, nie sú však konkrétne spájané s nadmerným podráždením kože (25) (26) (27) (28) (29).

24. Nasledujúce klinické pozorovania môžu indikovať systémovú toxicitu (30), ak sú súčasťou integrovaného posudzovania, to znamená, že môžu indikovať maximálnu dávku na použitie v hlavnej LLNA: BrdU-ELISA: zmeny funkcie nervového systému (napr. piloerekcia, ataxia, triaška a kŕče), zmeny správania (napr. agresia, zmena pri čistení, výrazná zmena stupňa aktivity), zmena dýchania (t. j. zmena frekvencie alebo intenzity dýchania, ako napríklad zadúšanie, dýchavičnosť a šelest) a zmeny spotreby potravy a vody. Okrem toho treba v hodnotení zvážiť príznaky letargie a/alebo apatie a akékoľvek klinické príznaky silnejšej alebo dlhodobejšej bolesti a utrpenia alebo viac ako 5 % zníženie telesnej hmotnosti medzi dňom 1 a 6 a úmrtnosť. Umierajúce zvieratá alebo zvieratá, ktoré majú zjavne silné bolesti alebo vykazujú príznaky silného utrpenia, by sa mali humánnym spôsobom usmrtiť (31).

Harmonogram pokusov v hlavnej štúdii

25. Harmonogram pokusov v rámci skúšky je takýto:

— Deň 1: Označte každé zviera a zaznamenajte jeho hmotnosť a akékoľvek klinické pozorovania. Začnite s aplikáciou 25 µl z príslušného zriedenia testovanej látky, samotného nosiča alebo pozitívnej kontroly (súbežnej alebo nedávnej, podľa laboratórnych pravidiel s prihliadnutím na odseky 11 – 15) na zadnú stranu každého ucha.

— Dni 2 a 3: Zopakujte aplikačný postup uskutočnený v deň 1.

— Deň 4: Žiadne ošetrenie.

— Deň 5: Intraperitoneálnou injekciou aplikujte 0,5 ml (5 mg/myš) roztoku BrdU (10 mg/ml).

— Deň 6: Zaznamenajte hmotnosť každého zvieraťa a akékoľvek klinické príznaky. Približne o 24 hodín po injekčnej aplikácii roztoku BrdU sa zvieratá humánne usmrtia. Drénované ušné lymfatické uzliny sa odstránia z každého ucha myši a jednotlivo sa spracujú vo fosfátom tlmenom fyziologickom roztoku (PBS) pre každé zviera. Údaje a diagramy identifikácie lymfatických uzlín a disekcie možno nájsť v odkaze (17). Pri ďalšom monitorovaní lokálnej odozvy kože v hlavnej štúdii možno do protokolu štúdie zahrnúť ďalšie parametre, ako napríklad hodnotenie erytému ucha alebo merania hrúbky ucha (získané pomocou meradla hrúbky alebo vážením vzoriek uší pri pitve).

▼M3

Príprava bunkových suspenzií

26. Jednobunková suspenzia buniek lymfatických uzlín (LNC) odobraná bilaterálne z každej myši sa pripravuje jemným mechanickým pretlačením cez sitko z nerezovej ocele so šírkou oka 200 μm alebo inou prijateľnou technikou na prípravu jednobunkovej suspenzie (napr. pomocou plastového mažiara na jedno použitie, ktorým sa lymfatické uzliny rozdrvia a následne prepasírujú cez nylonové sitko #70.) Postup na prípravu suspenzie buniek lymfatických uzlín je v tejto skúške veľmi dôležitý, a preto by každý odborník mal byť v tomto postupe vopred vyškolený. Navyše keďže lymfatické uzliny zvierat v negatívnej kontrole sú malé, dôležité je opatrné zaobchádzanie, aby sa predišlo umelým účinkom na hodnoty SI. V každom prípade by sa cieľový objem suspenzie buniek lymfatických uzlín mal prispôsobiť stanovenému optimalizovanému objemu (približne 15 ml). Optimalizovaný objem je založený na dosiahnutí priemernej absorbancie v negatívnej kontrolnej skupine v rozmedzí 0,1 – 0,2.

Stanovenie proliferácie buniek (meranie obsahu BrdU v DNA lymfocytov)

27. BrdU sa meria metódou ELISA pomocou komerčnej testovacej súpravy (napr. Roche Applied Science, Mannheim, Nemecko, katalógové číslo 11 647 229 001). V skratke 100 μl suspenzie buniek lymfatických uzlín sa trikrát pridá do jamiek mikroplatničky. Po fixácii a denaturácii buniek lymfatických uzlín sa do každej jamky pridá protilátka BrdU a čaká sa na reakciu. Následne sa protilátka BrdU odstráni umytím, pridá sa substrátový roztok a čaká sa na tvorbu chromogénu. Odmeria sa absorbancia 370 nm s referenčnou vlnovou dĺžkou 492 nm. Vo všetkých prípadoch by sa testovacie podmienky skúšky mali optimalizovať (pozri odsek 26).

POZOROVANIA

Klinické pozorovania

28. Každá myš sa starostlivo vyšetrí aspoň jedenkrát denne na všetky klinické príznaky, či už ide o lokálne podráždenie v mieste aplikácie, alebo systémovú toxicitu. Všetky pozorovania sa systematicky zaznamenávajú, pričom každá myš má individuálny záznam. Plány na monitorovanie by mali zahŕňať kritériá na rýchlu identifikáciu tých myší, ktoré vykazujú systémovú toxicitu, nadmerné lokálne podráždenie alebo poleptanie kože a ktoré majú byť humánne usmrtené (31).

Telesné hmotnosti

29. Ako sa uvádza v odseku 25, hmotnosti jednotlivých zvierat by sa mali odmerať na začiatku testu a pri naplánovanom humánnom usmrtení zvierat.

VÝPOČET VÝSLEDKOV

30. Výsledky v každej pokusnej skupine sa vyjadrujú ako priemerná hodnota stimulačného indexu (SI). SI sa vypočíta vydelením priemerného indexu označenia BrdU/myš v rámci každej skupiny, ktorej sa podáva testovaná látka, a pozitívnej kontrolnej skupiny priemerným indexom označenia BrdU v kontrolnej skupine s rozpúšťadlom/nosičom. Priemerná hodnota SI kontrolných skupín, ktorým sa podával nosič, je potom 1.

Index označenia BrdU sa definuje ako:

$$\text{Index označenia BrdU} = (ABS_{em} - \text{ABS prázdny}_{em}) - (ABS_{ref} - \text{ABS prázdny}_{ref}),$$

kde: em = emisná vlnová dĺžka a ref = referenčná vlnová dĺžka.

▼M3

31. V rozhodovacom procese sa za pozitívny výsledok považuje stimulačný index ≥ 1,6 (10). Pri určovaní toho, či hraničný výsledok (napr. hodnota SI v rozmedzí od 1,6 do 1,9) je pozitívny, sa však môže použiť aj sila vzťahu medzi dávkou a odozvou, štatistický význam a konzistentnosť rozpúšťadla/nosiča a odoziev pozitívnej kontroly (3) (6) (32).

32. Pri hraničnom výsledku SI od 1,6 do 1,9 môžu používatelia na potvrdenie toho, že také výsledky sú pozitívne, zvážiť doplňujúce informácie, ako napríklad vzťah medzi dávkou a odozvou, dôkazy systémovej toxicity alebo nadmerného podráždenia a v prípade potreby štatistický význam spolu s hodnotami SI (10). Pozornosť by sa mala venovať aj rôznym vlastnostiam testovanej látky vrátane toho, či má štrukturálny vzťah k látkam, ktoré sú známymi senzibilizátormi, či spôsobuje nadmerné podráždenie kože, a vrátane charakteru pozorovanej odozvy na dávku. Tieto a ostatné hľadiská sa podrobne rozoberajú inde (4).

33. Zber údajov na úrovni jednotlivých myší umožní vykonať štatistickú analýzu prítomnosti a úrovne vzťahu medzi dávkou a odozvou v údajoch. Každé štatistické posúdenie by mohlo zahŕňať hodnotenie vzťahu medzi dávkou a odozvou, ako aj vhodne upravené porovnávania testovaných skupín (napr. porovnávania v pároch skupiny, ktorej sa podáva dávka, a súbežnej kontrolnej skupiny s rozpúšťadlom/nosičom). Štatistické analýzy môžu zahŕňať napr. lineárnu regresiu alebo Williamsov test na posúdenie trendov vo vzťahu medzi dávkou a odozvou a Dunnettov test na porovnávanie v pároch. Pri výbere vhodnej metódy štatistickej analýzy by si výskumný pracovník mal uvedomovať možné nerovnosti rozdielov a ďalšie súvisiace problémy, ktoré si môžu vyžadovať premenu údajov alebo štatistickú analýzu založenú na iných ako parametrických údajoch. Výskumný pracovník bude možno v každom prípade musieť vykonať výpočty SI a štatistické analýzy s určitými dátovými bodmi a bez nich (niekedy sa tieto údaje nazývajú „extrémne hodnoty“).

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

34. Údaje by sa mali zhrnúť vo forme tabuľky, v ktorej sa uvádzajú hodnoty indexu označenia BrdU jednotlivých zvierat, priemerný skupinový index označenia BrdU/zviera, súvisiaci rozsah chyby (napr. SD, SEM) a stredná hodnota SI pre každú skupinu s dávkou v porovnaní so súbežnou kontrolnou skupinou s rozpúšťadlom/nosičom.

Správa o teste

35. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testované a kontrolné chemické látky:

— identifikačné údaje (napr. čísla CAS, čísla EC, ak sú k dispozícii, zdroj, čistota, známe nečistoty, číslo šarže),

— fyzikálny charakter a fyzikálno-chemické vlastnosti (napr. prchavosť, stabilita, rozpustnosť),

— v prípade zmesi zloženie a relatívny percentuálny podiel zložiek.

Rozpúšťadlo/nosič:

— identifikačné údaje (čistota, v prípade potreby koncentrácia, použitý objem),

— zdôvodnenie voľby nosiča.

▼M3

Testovacie zvieratá:

— použitý kmeň myší CBA,

— mikrobiologický stav zvierat, ak je známy,

— počet a vek zvierat,

— zdroj zvierat, podmienky umiestnenia, krmivo atď.

Podmienky testu:

— zdroj, číslo šarže a kontrolné údaje výrobcu o kvalite/presnosti (citlivosť a špecifickosť protilátky a limit detekcie) pre súpravu ELISA,

— informácie o príprave a aplikácii testovanej látky,

— zdôvodnenie výberu dávky (vrátane výsledkov z predbežného skríningového testu, ak sa uskutočnil),

— použité koncentrácie nosiča a testovanej látky a celkové množstvo aplikovanej testovanej látky,

— údaje o kvalite krmiva a vody (vrátane druhu/zdroja krmiva, zdroja vody),

— podrobný opis harmonogramu podávania dávok a odberu vzoriek,

— metódy merania toxicity,

— kritériá na hodnotenie štúdií ako pozitívnych alebo negatívnych,

— informácie o akýchkoľvek odchýlkach od protokolu a vysvetlenie, ako odchýlky ovplyvňujú návrh a výsledky štúdie.

Kontrola spoľahlivosti:

— súhrn výsledkov poslednej kontroly spoľahlivosti vrátane informácií o testovanej látke, koncentrácii a použitom nosiči,

— súbežné a/alebo historické kontrolné údaje o pozitívnej a súbežnej negatívnej kontrole (s rozpúšťadlom/nosičom) pre testovacie laboratórium,

— ak nebola zahrnutá súbežná pozitívna kontrola, dátum a laboratórna správa o najaktuálnejšej periodickej pozitívnej kontrole a správa s historickými údajmi o pozitívnej kontrole, ktorými laboratórium zdôvodňuje nevykonanie súbežnej pozitívnej kontroly.

Výsledky:

— hmotnosti jednotlivých myší na začiatku podávania dávky a pri naplánovanom humánnom usmrtení, ako aj priemerný a súvisiaci rozsah chyby (napr. SD a SEM) pre každú pokusnú skupinu,

— časový priebeh nástupu príznakov toxicity u každého zvieraťa vrátane podráždenia kože v mieste podania látky, ak sa vyskytnú,

— tabuľka indexov označenia BrdU u jednotlivých myší a hodnoty SI v každej pokusnej skupine,

— priemerný a súvisiaci rozsah chyby (napr. SD, SEM) v súvislosti s indexom označenia BrdU/myš v každej pokusnej skupine a výsledky analýzy extrémnej hodnoty v každej pokusnej skupine,

▼M3

— výpočet SI a vhodné opatrenie variability, ktoré berie do úvahy variabilitu medzi zvieratami v skupinách, ktorým sa podáva testovaná látka, a v kontrolných skupinách,

— vzťah medzi dávkou a odozvou,

— v prípade potreby štatistické analýzy.

Rozbor výsledkov:

— stručný komentár v súvislosti s výsledkami, analýza odozvy na dávku, štatistické analýzy, ak existujú, s uvedením záveru, či by sa testovaná látka mala považovať za látku spôsobujúcu senzibilizáciu kože.

LITERATÚRA

1. OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

2. Chamberlain, M. and Basketter, D. A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. Food Chem. Toxicol., 34, 999 – 1002.

3. Basketter, D. A., Gerberick, G. F., Kimber, I. and Loveless, S. E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 34, 985 – 997.

4. Basketter, D. A., Gerberick, G. F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. Food Chem. Toxicol., 36, 327 – 333.

5. Van Och, F. M. M., Slob, W., De Jong, W. H., Vandebriel, R. J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. Toxicol., 146, 49 – 59.

6. ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No 99-4494. Research Triangle Park, N.C. K dispozícii na stránke: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna/llnarep.pdf].

7. Dean, J. H., Twerdok, L. E., Tice, R. R., Sailstad, D. M., Hattan, D. G., Stokes, W. S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 258 – 273.

8. Haneke, K. E., Tice, R. R., Carson, B. L., Margolin, B. H., Stokes, W. S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 274 – 286.

9. Sailstad, D. M., Hattan, D., Hill, R. N., Stokes, W. S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process. Reg. Toxicol. Pharmacol., 34(3), 249 – 257.

10. ICCVAM (2010), ICCVAM Test Method Evaluation Report. Nonradioactive local lymph node assay: BrdU-ELISA Test Method Protocol (LLNA: BrdU-ELISA). NIH Publication No 10-7552A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozícii na stránke: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm].

▼M3

11. ICCVAM (2009), Independent Scientific Peer Review Panel Report: Updated validation status of new versions and applications of the murine local lymph node assay: a test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals and products. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozícii na stránke: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/LLNAPRPRept2009.pdf].

12. Takeyoshi, M., Iida, K., Shiraishi, K. and Hoshuyama, S. (2005), Novel approach for classifying chemicals according to skin sensitising potency by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. J. Appl. Toxicol., 25, 129 – 134.

13. OECD (1992), Skin Sensitisation, Test Guideline No 406, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

14. Kreiling, R., Hollnagel, H. M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M. S., Griem, P., Dreessen, B., Kleber, M., Albrecht, A., Garcia, C. and Wendel, A. (2008), Comparison of the skin sensitising potential of unsaturated compounds as assessed by the murine local lymph node assay (LLNA) and the guinea pig maximization test (GPMT). Food Chem. Toxicol., 46, 1896 – 1904.

15. Basketter, D., Ball, N., Cagen, S., Carrilo, J. C., Certa, H., Eigler, D., Garcia, C., Esch, H., Graham, C., Haux, C., Kreiling, R. and Mehling, A. (2009), Application of a weight of evidence approach to assessing discordant sensitisation datasets: implications for REACH. Reg. Toxicol. Pharmacol., 55, 90 – 96.

16. ILAR (1996), Institute of Laboratory Animal Research (ILAR) Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 7th ed. Washington, DC: National Academies Press.

17. ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay. NIH Publication Number 09-7357. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozícii na stránke: [http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/immunotox_docs/llna-ps/LLNAPerfStds.pdf].

18. McGarry, H. F. (2007), The murine local lymph node assay: regulatory and potency considerations under REACH. Toxicol., 238, 71 – 89.

19. Kimber, I., Dearman, R. J., Scholes E. W. and Basketter, D. A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications. Toxicol., 93, 13 – 31.

20. OECD (2002), Acute Dermal Irritation/Corrosion, Test Guideline No 404, Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

21. Reeder, M. K., Broomhead, Y. L., DiDonato, L., and DeGeorge, G. L. (2007), Use of an enhanced local lymph node assay to correctly classify irritants and false positive substances. Toxicologist, 96, 235.

22. ICCVAM (2009), Nonradioactive Murine Local Lymph Node Assay: Flow Cytometry Test Method Protocol (LLNA: BrdU-FC) Revised Draft Background Review Document. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozícii na stránke: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf].

23. Hayes, B. B., Gerber, P. C., Griffey, S. S., and Meade, B. J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice. Drug Chem. Toxicol., 21, 195 – 206.

24. Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H. C., Ruzicka, T., Ahr, H. J., Lehmann, P. and Vohr, V. W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions. Toxicol. Appl. Pharmacol., 153, 83 – 94.

25. Woolhiser, M. R., Hayes, B. B., and Meade, B. J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals. Toxicol. Meth., 8, 245 – 256.

▼**M3**

26. Hayes, B. B., and Meade, B. J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods. Drug. Chem. Toxicol., 22, 491 – 506.

27. Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A. O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R., and Vohr, H. W. (2005), A European inter- laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. Toxicol., 212, 60 – 68.

28. Vohr, H. W. and Ahr, H. J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? Arch. Toxicol., 79, 721 – 728.

29. Patterson, R. M., Noga, E. and Germolec D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract. Environ. Health Perspect., 115, 1023 – 1028.

30. ICCVAM (2009), Report on the ICCVAM-NICEATM/ECVAM/JaCVAM Scientific Workshop on Acute Chemical Safety Testing: Advancing *In Vitro* Approaches and Humane Endpoints for Systemic Toxicity Evaluations. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. K dispozícii na stránke: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/Tox_workshop.htm].

31. OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

32. Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R. J., Gerberick, G. F., Ryan, C. A., Basketter, D. A., Lea, L., House, R. V., Ladies, G. S., Loveless, S. E., and Hastings, K. L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. J. Toxicol. Environ.l Health, 53, 563 – 579.

33. OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. K dispozícii na stránke: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

▼**M3**

DODATOK 1

VYMEDZENIE POJMOV

Presnosť: Miera zhody výsledkov testovacej metódy s akceptovanými referenčnými hodnotami. Ide o opatrenie výkonnosti testovacej metódy a jeden z aspektov relevantnosti. Tento pojem sa často používa ako synonymum s pojmom „zhoda“ a označuje podiel správnych výsledkov testovacej metódy (33).

Referenčná látka: Látka spôsobujúca alebo nespôsobujúca senzibilizáciu, ktorá sa používa ako štandardná látka na porovnávanie s testovanou látkou. Referenčná látka by mala mať tieto vlastnosti: i) konzistentný(-é) a spoľahlivý(-é) zdroj(-e); ii) štrukturálnu a funkčnú podobnosť s triedou látok, ktoré sa budú testovať; iii) známe fyzikálno-chemické vlastnosti; iv) podporné údaje o známych účinkoch a v) známu potenciu v rozsahu želanej odozvy.

Falošný negatívny výsledok: Testovaná látka je testovanou metódou nesprávne identifikovaná ako negatívna alebo neaktívna, pričom v skutočnosti je pozitívna alebo aktívna (33).

Falošný pozitívny výsledok: Testovaná látka je testom nesprávne identifikovaná ako pozitívna alebo aktívna, pričom v skutočnosti je negatívna alebo neaktívna (33).

Nebezpečnosť: Potenciál škodlivého účinku na zdravie alebo životné prostredie. Škodlivý účinok sa prejavuje až pri dostatočnej hladine expozície.

Medzilaboratórna reprodukovateľnosť: Miera, do akej rôzne kvalifikované laboratóriá, ktoré používajú rovnaký protokol a testujú rovnaké testovacie látky, dokážu dosiahnuť kvalitatívne a kvantitatívne podobné výsledky. Medzilaboratórna reprodukovateľnosť sa určuje počas postupov pred validáciou a v rámci postupov validácie a znamená mieru, do akej možno test úspešne prenášať medzi laboratóriami. Takisto je známa ako reprodukovateľnosť medzi laboratóriami (33).

Vnútrolaboratórna reprodukovateľnosť: Určenie miery, do akej kvalifikovaní pracovníci v rámci jedného laboratória dokážu úspešne opakovať výsledky s použitím konkrétneho protokolu v rôznom čase. Takisto je známa ako reprodukovateľnosť v rámci laboratória (33).

Extrémna hodnota: Extrémna hodnota je pozorovanie, ktoré je značne odlišné od ostatných hodnôt v náhodnej vzorke z populácie.

Zabezpečovanie kvality: Riadiaci proces, v ktorom jednotlivci nezávislí od osôb vykonávajúcich testy posudzujú súlad s laboratórnymi testovacími normami, požiadavkami a postupmi vedenia záznamov, ako aj presnosť prenosu údajov.

Spoľahlivosť: Meria rozsah, v rámci ktorého sa môže testovacia metóda počas istého časového obdobia opakovane vykonávať v rámci laboratórií a medzi nimi navzájom, pričom sa používa ten istý protokol. Posudzuje sa vypočítaním vnútrolaboratórnej a medzilaboratórnej reprodukovateľnosti (33).

Senzibilizácia kože: Imunologický proces, ku ktorému dochádza po lokálnom vystavení náchylného jednotlivca chemickému alergénu, ktorý vyvoláva kožnú imunitnú odozvu, ktorá môže viesť k vzniku kontaktnej senzibilizácie.

Stimulačný index (SI): Hodnota vypočítaná na posúdenie potenciálu testovanej látky spôsobiť senzibilizáciu kože; ide teda o pomer proliferácie v pokusných skupinách a proliferácie v súbežných kontrolných skupinách, ktorým sa podáva nosič.

Testovaná látka (tiež sa nazýva testovaná chemikália): Akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

▼M4

B.52. AKÚTNA INHALAČNÁ TOXICITA – METÓDA AKÚTNEJ TOXICKEJ TRIEDY

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s Usmerneniami OECD na vykonávanie testov (TG) 436 (2009). Prvé usmernenia TG 403 na vykonávanie testov akútnej inhalácie boli prijaté v roku 1981 a medzičasom boli revidované [pozri kapitolu B.2 tejto prílohy (1)]. Po prijatí revidovanej metódy orálnej akútnej toxickej triedy (ATC) (kapitola B.1b tejto prílohy) (5) sa považovalo za vhodné vypracovať metódu inhalačnej ATC (2) (3) (4). Z retrospektívneho hodnotenia výkonnosti metódy ATC pre akútnu inhalačnú toxicitu vyplynulo, že metóda je vhodná na účely klasifikácie a označovania (6). Testovacia metóda inhalačnej ATC umožní použitie po sebe nasledujúcich stupňov pevne stanovených cieľových koncentrácií na účely klasifikácie toxicity testovanej chemikálie. Kľúčovým parametrom je letalita, ale zvieratá, ktoré majú bolesti, trpia alebo sú moribundné, by sa mali humánne utratiť, aby sa minimalizovalo ich utrpenie. Usmernenia k humánnym parametrom sú k dispozícii v usmerňovacom dokumente OECD č. 19 (7).

2. Usmernenia k vykonaniu a interpretácii tejto testovacej metódy sú k dispozícii v Usmerňovacom dokumente č. 39 o testovaní akútnej inhalačnej toxicity (GD 39) (8).

3. Vymedzenie pojmov použitých v súvislosti s touto testovacou metódou je uvedené v dodatku 1 a v dokumente GD 39 (8).

4. Testovacia metóda poskytuje informácie o nebezpečných vlastnostiach a umožňuje, aby bolo možné testovanú chemikáliu zatriediť a klasifikovať podľa nariadenia (ES) č. 1272/2008 o klasifikácii chemikálií, ktoré spôsobujú akútnu toxicitu (9). V prípade, že sa vyžadujú bodové odhady hodnôt LC_{50} alebo analýzy vzťahu koncentrácie a reakcie, je kapitola B.2 tejto prílohy (1) vhodnou testovacou metódou, ktorú možno použiť. Ďalšie usmernenia o výbere testovacej metódy sú uvedené v dokumente GD 39 (8). Táto testovacia metóda nie je osobitne určená na testovanie špecializovaných materiálov, ako sú slabo rozpustné izometrické alebo vláknité materiály alebo priemyselne vyrábané nanomateriály.

ÚVODNÉ ÚVAHY

5. Pred zvažovaním testovania podľa tejto testovacej metódy by testovacie laboratórium malo zohľadniť všetky dostupné informácie o testovanej chemikálii vrátane existujúcich štúdií obsahujúcich údaje, na základe ktorých sa ďalšie testovanie neodporúča s cieľom minimalizovať využívanie zvierat. Informácie, ktoré môžu pomôcť pri výbere najvhodnejšieho druhu, kmeňa, pohlavia, spôsobu expozície a primeraných testovacích koncentrácií, zahŕňajú identitu, chemickú štruktúru a fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej chemikálie, výsledky všetkých testov toxicity *in vitro* alebo *in vivo*, predpokladané použitia a potenciál expozície človeka, dostupné údaje (Q)SAR a toxikologické údaje o štrukturálne príbuzných chemikáliách. Koncentrácie, pri ktorých sa predpokladá, že spôsobia silnú bolesť a utrpenie v dôsledku žieravého ([1]) alebo silno dráždivého pôsobenia, by sa nemali testovať podľa tejto testovacej metódy [pozri dokument GD 39 (8)].

([1]) Hodnotenie žieravosti môže byť založené na odbornom posudku s využitím takých dôkazov, ako sú: skúsenosti u ľudí a pri zvieratách, existujúce údaje (in vitro), napr. kapitola B.40 (10), B.40a (11) tejto prílohy alebo dokument OECD TG 435 (12), hodnoty pH, informácie o podobných chemikáliách alebo akékoľvek iné súvisiace údaje.

▼M4

PRINCÍP TESTU

6. Princíp testu spočíva v tom, že v rámci postupu niekoľkých krokov sa v priebehu expozície v trvaní štyroch hodín o akútnej inhalačnej toxicite testovanej chemikálie získajú dostatočné informácie, ktoré umožnia jej klasifikáciu. Na špecifické regulačné účely možno použiť iné intervaly expozície. V každom kroku, pre ktorý je vymedzená koncentrácia, sa testujú tri zvieratá z každého pohlavia. V závislosti od mortality a/alebo moribundného stavu zvierat môžu na posúdenie akútnej toxicity testovanej chemikálie postačovať dva kroky. Ak sú k dispozícii dôkazy o tom, že jedno pohlavie je vnímavejšie ako druhé, potom môže test pokračovať s využitím iba vnímavejšieho pohlavia. V závislosti od výsledku predchádzajúceho kroku bude nasledovať tento krok:

a) nie je potrebné ďalšie testovanie;

b) testovanie troch zvierat z každého pohlavia alebo

c) testovanie šiestich zvierat vnímavejšieho pohlavia, t. j. nižšie hraničné odhady toxickej triedy budú založené na šiestich zvieratách v každej skupine s koncentráciou bez ohľadu na pohlavie.

7. Moribundné zvieratá alebo zvieratá so zjavnými bolesťami, alebo zvieratá, ktoré vykazujú príznaky silného a trvalého utrpenia, by sa mali humánnym spôsobom usmrtiť, pričom pri interpretácii výsledkov testu sa vyhodnocujú rovnako ako zvieratá, ktoré uhynuli pri teste. Kritériá na rozhodnutie usmrtiť moribundné alebo silne trpiace zvieratá a usmernenie o uznaní predvídateľnej alebo nastávajúcej smrti sú predmetom Usmerňovacieho dokumentu č. 19 o humánnych parametroch (Humane Endpoints Guidance Document) (7).

OPIS METÓDY

Výber druhov zvierat

8. Používajú sa zdravé mladé dospelé zvieratá bežne používaných laboratórnych kmeňov. Najvhodnejším zvieraťom je potkan. Použitie iných druhov zvierat je nutné odôvodniť.

Príprava zvierat

9. Používajú sa samice, ktoré nikdy nevrhli mláďatá a sú negravidné. V deň expozície by zvieratá mali byť mladé dospelé jedince vo veku od 8 do 12 týždňov a ich telesná hmotnosť by mala byť v rozmedzí ± 20 % strednej hmotnosti jednotlivých pohlaví všetkých zvierat toho istého veku, ktoré boli exponované skôr. Zvieratá sa vyberajú náhodne a označia sa na účely individuálnej identifikácie. Zvieratá sa umiestnia do klietok najmenej na päť dní pred začatím testu, aby sa aklimatizovali na laboratórne podmienky. Zvieratá by sa na krátky čas pred testovaním mali aklimatizovať aj na testovacie zariadenie, lebo sa tak zníži stres spôsobený uvedením do nového prostredia.

Chov zvierat

10. Teplota miestnosti, kde sa pokusné zviera chová, by mala byť 22 ± 3 °C. Relatívna vlhkosť by sa v ideálnom prípade mala udržiavať v rozsahu od 30 do 70 %, hoci to nemusí byť možné, ak sa ako nosič používa voda. Pred a po expozícii sú zvieratá zvyčajne umiestnené v klietkach podľa pohlavia a koncentrácie, ale počet zvierat v jednej klietke by nemal prekážať bezproblémovému pozorovaniu každého zvieraťa, pričom by sa mali minimalizovať straty súvisiace so vzájomným požieraním alebo bojom jedincov. V prípade, že sa použije iba expozícia oblasti nosa, môže byť potrebné, aby sa zvieratá aklimatizovali na skúmavky obmedzujúce pohyb. Skúmavky by nemali zvieratám spôsobovať neprimeraný stres súvisiaci s fyzikálnymi vlastnosťami, teplotou alebo obmedzením pohybu. Obmedzenie môže mať

▼M4

vplyv na fyziologické sledované parametre, ako sú telesná teplota (hypertermia) a/alebo respiračný minútový objem. Ak sú k dispozícii všeobecné údaje, podľa ktorých k takýmto zmenám nedochádza vo veľkej miere, potom skúmavky nie je potrebné vopred upraviť. Zvieratá vystavené účinkom aerosólu celým telom by sa mali v priebehu expozície umiestniť samostatne, aby sa zabránilo filtrovaniu testovaného aerosólu cez srsť ostatných zvierat v klietke. S výnimkou času trvania expozície sa na kŕmenie môže používať bežné a osvedčené laboratórne krmivo s neobmedzenou dodávkou miestnej pitnej vody. Osvetlenie by malo byť umelé a malo by sa striedať 12 hodín svetla a 12 hodín tmy.

Inhalačné komory

11. Pri výbere inhalačnej komory by sa mal vziať do úvahy charakter testovanej chemikálie a cieľ testu. Uprednostňuje sa expozícia oblasti nosa (pričom tento pojem zahŕňa expozíciu hlavy, nosa alebo pysku). Vo všeobecnosti sa pri štúdiách kvapalných alebo tuhých aerosólov a pár, ktoré môžu kondenzovať a vytvárať aerosóly, uprednostňuje expozícia oblasti nosa. Špeciálne ciele štúdie možno lepšie dosiahnuť použitím expozície celého tela, ale tento krok je potrebné v správe o štúdii odôvodniť. Na zabezpečenie stability prostredia pri používaní komory na expozíciu celého tela by celkový objem testovaných zvierat nemal presiahnuť 5 % objemu komory. Princípy metód expozície celého tela a oblasti nosa a ich konkrétne výhody a nevýhody sú opísané v dokumente GD 39 (8).

PODMIENKY EXPOZÍCIE

Podávanie koncentrácií

12. Odporúča sa použitie stabilného intervalu expozície v trvaní štyroch hodín, do ktorých nie je započítaný čas na dosiahnutie rovnováhy. Na splnenie špecifických požiadaviek môžu byť nutné iné intervaly, v správe o štúdii však treba uviesť odôvodnenie [pozri dokument GD 39 (8)]. Zvieratá exponované v komorách na expozíciu celého tela by mali byť umiestnené samostatne, aby sa zabránilo požitiu testovanej chemikálie v dôsledku očisťovania tela ostatnými zvieratami v klietke. Počas trvania expozície by sa zviera nemalo kŕmiť. V priebehu expozície celého tela sa zvieraťu môže podať voda.

13. Zvieratá sú vystavené pôsobeniu testovanej chemikálie vo forme plynu, pary, aerosólu alebo ich kombinácie. Fyzikálne skupenstvo, ktoré sa testuje, závisí od fyzikálno-chemických vlastností testovanej chemikálie, zvolenej koncentrácie a/alebo najpravdepodobnejšej fyzikálnej formy pri manipulácii a používaní testovanej chemikálie. Hygroskopické a chemicky reaktívne testované chemikálie by sa mali testovať v podmienkach suchého vzduchu. Treba dbať na to, aby sa nevytvorili výbušné koncentrácie.

Rozdelenie veľkosti častíc

14. Častice by sa mali rozdeliť podľa veľkosti v prípade všetkých aerosólov a pár, ktoré môžu kondenzovať a vytvárať aerosóly. Na umožnenie expozície všetkých relevantných oblastí dýchacej sústavy sa odporúčajú aerosóly so stredným aerodynamickým hmotnostným priemerom (MMAD) v rozsahu od 1 do 4 μm so štandardnou odchýlkou geometrického priemeru (σ_g) v rozsahu od 1,5 do 3,0 (8) (13) (14). Hoci by sa malo vynaložiť značné úsilie na dodržanie tejto normy, pokiaľ túto podmienku nie je možné splniť, treba predložiť odborný posudok. Napríklad v prípade kovových dymov môžu byť častice menšie, ako stanovuje táto norma, a takisto nabité častice, vlákna a hygroskopické materiály (ktoré sa vo vlhkom prostredí dýchacej sústavy zväčšujú) môžu túto normu prekračovať.

▼M4

Príprava testovanej chemikálie v nosiči

15. Na prípravu vhodnej koncentrácie a veľkosti častíc testovanej chemikálie v ovzduší možno použiť nosič. Spravidla sa uprednostňuje voda. Tuhý materiál môže byť podrobený mechanickým procesom s cieľom dosiahnuť požadovanú distribúciu veľkosti častíc, treba však dbať na to, aby sa testovaná chemikália nerozložila ani nezmenila. V prípadoch, v ktorých sa usudzuje, že sa pôsobením mechanických procesov zmenilo zloženie testovanej chemikálie (napr. extrémna teplota spôsobená nadmerným mletím v dôsledku trenia), by sa zloženie testovanej chemikálie malo analyticky overiť. Treba dať pozor, aby sa testovaná chemikália neznečistila. Nie je potrebné testovať nedrobivé granulované materiály, ktoré sa účelovo pripravujú tak, aby nebolo možné ich inhalovať. Na preukázanie, že pri manipulácii s granulovaným materiálom nevznikajú dýchateľné častice, by sa mal vykonať test opotrebovania. Ak pri teste opotrebovania vzniknú dýchateľné častice, treba uskutočniť test inhalačnej toxicity.

Kontrolné zvieratá

16. Súbežná negatívna kontrolná skupina (ovzdušia) nie je potrebná. V prípade, že sa na vytvorenie testovacieho ovzdušia použije iný nosič ako voda, sa kontrolná skupina nosiča použije iba vtedy, ak nie sú k dispozícii staršie údaje o inhalačnej toxicite. Ak sa pri štúdii toxicity testovanej chemikálie pripravenej v nosiči nezistí žiadna toxicita, znamená to, že nosič pri testovanej koncentrácii nie je toxický, a teda kontrola nosiča nie je potrebná.

MONITOROVANIE PODMIENOK EXPOZÍCIE

Prúdenie vzduchu v komore

17. Prúdenie vzduchu cez komoru by sa počas každej expozície malo dôkladne kontrolovať, nepretržite monitorovať a zaznamenávať aspoň raz za hodinu. Monitorovanie koncentrácie testovacieho ovzdušia (alebo stability) je integrálne meranie všetkých dynamických parametrov a poskytuje nepriamy prostriedok kontroly všetkých relevantných dynamických parametrov tvorby ovzdušia. Osobitne treba dbať na to, aby sa zabránilo opätovnému vdýchnutiu v komorách na expozíciu oblasti nosa v prípadoch, v ktorých prúdenie vzduchu cez systém expozície nestačí na zabezpečenie dynamického prúdenia vzduchu s testovanou chemikáliou. Existujú predpísané metodiky, prostredníctvom ktorých možno dokázať, že v zvolených prevádzkových podmienkach nedochádza k opätovnému vdýchnutiu (8) (15). Koncentrácia kyslíka by mala byť minimálne 19 % a koncentrácia oxidu uhličitého by nemala presiahnuť 1 %. Ak existuje dôvod domnievať sa, že tieto normy nie je možné splniť, koncentrácie kyslíka a oxidu uhličitého by sa mali zmerať.

Teplota komory a relatívna vlhkosť

18. Komora by sa mala udržiavať pri teplote 22 ± 3 °C. Relatívna vlhkosť v dýchacej zóne zvierat, a to v prípade expozície oblasti nosa, ako aj v prípade expozície celého tela, by sa mala monitorovať a zaznamenávať minimálne trikrát počas expozície v trvaní až štyroch hodín a v prípade kratšej expozície každú hodinu. Relatívna vlhkosť by sa ideálne mala udržiavať v rozsahu od 30 do 70 %, ale môže sa stať, že táto hodnota bude nedosiahnuteľná (napr. v prípade testovania zmesí na báze vody) alebo nemerateľná z dôvodu interferencie testovanej chemikálie a testovacej metódy.

▼M4

Testovaná chemikália: nominálna koncentrácia

19. Vždy, keď je to možné, by sa mala vypočítať a zaznamenať nominálna koncentrácia expozície v komore. Nominálna koncentrácia je hmotnosť vytvorenej testovanej chemikálie vydelená celkovým objemom vzduchu, ktorý prešiel systémom komory. Nominálna koncentrácia sa nepoužíva na charakterizáciu expozície zvierat, ale porovnanie nominálnej a skutočnej koncentrácie vypovedá o účinnosti vytvárania testovacieho systému, a teda sa môže použiť na zistenie problémov s tvorbou.

Testovaná chemikália: skutočná koncentrácia

20. Skutočná koncentrácia je koncentrácia testovanej chemikálie v dýchacej zóne zvierat v inhalačnej komore. Skutočné koncentrácie možno získať špecifickými metódami (napr. priamym odberom vzorky, adsorpčnými alebo chemicky reaktívnymi metódami a následnou analytickou charakterizáciou) alebo nešpecifickými metódami, ako je gravimetrická filtrová analýza. Použitie gravimetrickej analýzy je prípustné iba v prípade jednozložkových práškových aerosólov alebo aerosólov kvapalín s nízkou prchavosťou, pričom je potrebné túto analýzu podložiť primeranými testovými charakterizáciami predbežných štúdií týkajúcich sa konkrétnej testovanej chemikálie. Koncentráciu viaczložkových práškových aerosólov takisto možno stanoviť prostredníctvom gravimetrickej analýzy. V tom prípade sú však potrebné analytické údaje, ktoré dokazujú, že zloženie materiálu vo vzduchu je podobné ako zloženie východiskového materiálu. Ak tieto informácie nie sú dostupné, môže byť potrebná opätovná analýza testovanej chemikálie (ideálne v jej skupenstve v ovzduší) v pravidelných intervaloch v priebehu štúdie. V prípade aerosólových látok, ktoré sa môžu vyparіť alebo môžu sublimovať, by sa malo preukázať, že všetky fázy sa zhromaždili pomocou zvolenej metódy. V správe o štúdii by sa mali uviesť cieľové, nominálne a skutočné koncentrácie. Na výpočet hodnôt smrteľných koncentrácií sa však v štatistických analýzach použijú iba skutočné koncentrácie.

21. Ak je to možné, mala by sa použiť jedna dávka testovanej chemikálie, pričom testovaná vzorka by sa mala uskladniť za podmienok, za ktorých sa zachová jej čistota, homogenita a stabilita. Pred začatím štúdie by mala byť k dispozícii charakterizácia testovanej chemikálie vrátane jej čistoty a, ak je to technicky možné, identity a množstiev identifikovaných kontaminantov a prímesí. Charakterizáciu možno preukázať napríklad týmito údajmi: retenčný čas a relatívna plocha píku, molekulová hmotnosť získaná pomocou analýzy hmotnostnej spektrometrie alebo plynovej chromatografie alebo iné odhady. Hoci za identitu testovanej vzorky testovacie laboratórium nenesie zodpovednosť, je vhodné, aby testovacie laboratórium aspoň čiastočne potvrdilo charakterizáciu poskytnutú dodávateľom (napr. farbu, fyzikálne skupenstvo atď.).

22. Prostredie expozície by malo byť čo najstálejšie a malo by sa nepretržite a/alebo občasne monitorovať v závislosti od metódy analýzy. Ak sa použije občasný odber vzoriek, vzorky ovzdušia komory by sa mali v priebehu štvorhodinovej štúdie odobrať najmenej dvakrát. Ak to pre nízky prietok vzduchu alebo nízke koncentrácie nie je možné, môže sa v priebehu celého intervalu expozície odobrať jedna vzorka. Ak sa medzi jednotlivými vzorkami vyskytnú výrazné výkyvy, pri ďalších testovaných koncentráciách by sa mali použiť štyri vzorky z každej expozície. Jednotlivé vzorky koncentrácie v komore by sa nemali od strednej koncentrácie v komore odchýliť o viac ako ± 10 % v prípade plynov a pár a o viac ako ± 20 % v prípade kvapalných alebo tuhých aerosólov. Čas na dosiahnutie rovnováhy v komore (t_{95}) by sa mal vypočítať a zaznamenať. Interval expozície zahŕňa čas, keď sa testovaná chemikália tvorí, pričom sa zohľadňujú aj časy potrebné na dosiahnutie t_{95}. Usmernenia k odhadovaniu t_{95} sú uvedené v dokumente GD 39 (8).

▼M4

23. V prípade veľmi komplexných zmesí tvorených parami/plynmi a aerosólov (napr. spaľovacieho ovzdušia a testovaných chemikálií poháňaných účelovými výrobkami/zariadeniami koncového použitia) sa v inhalačnej komore môže každá fáza správať inak, takže by sa mala vybrať aspoň jedna látka slúžiaca ako ukazovateľ (analyt), najčastejšie hlavná aktívna látka v zmesi, každej fázy (para/plyn a aerosól). Ak je testovaná chemikália zmes, v správe by sa mala uviesť analytická koncentrácia celej zmesi, nielen aktívnej látky alebo zložky (analyt). Ďalšie informácie týkajúce sa skutočných koncentrácií sú uvedené v dokumente GD 39 (8).

Testovaná chemikália: rozdelenie veľkosti častíc

24. Rozdelenie veľkosti častíc aerosólov by sa malo stanoviť aspoň dvakrát v priebehu každej expozície v trvaní štyroch hodín, a to pomocou kaskádového impaktora alebo alternatívneho prístroja, ako je napríklad aerodynamický spektrometer častíc. Ak možno preukázať rovnocennosť výsledkov získaných pomocou kaskádového impaktora a alternatívneho prístroja, potom sa alternatívny prístroj môže používať počas celej štúdie. Druhé zariadenie, ako je gravimetrický filter alebo impinger/premývačka, by sa malo použiť súbežne s hlavným prístrojom na potvrdenie zachytávacej účinnosti hlavného prístroja. Hmotnostná koncentrácia získaná analýzou veľkosti častíc by mala byť v rozsahu primeraných limitov hmotnostnej koncentrácie získanej filtrovou analýzou [pozri dokument GD 39 (8)]. Ak možno preukázať rovnocennosť v počiatočnej fáze štúdie, nie je potrebné vykonávať ďalšie potvrdzujúce merania. V záujme zabezpečenia dobrých životných podmienok pre zvieratá by sa mali prijať opatrenia na minimalizáciu nejednoznačných údajov, ktoré môžu viesť k potrebe opakovať expozíciu. Rozdelenie veľkosti častíc by sa malo vykonať v prípade pár, ak existuje možnosť, že kondenzácia pary môže mať za následok tvorbu aerosólu, alebo ak sa v ovzduší pár zistia častice s potenciálom zmiešaných fáz (pozri odsek 14).

POSTUP

Základný test

25. V každom kroku sa použijú tri zvieratá z každého pohlavia alebo šesť zvierat vnímavejšieho pohlavia. Ak sa v prípade iných hlodavcov ako potkanov použije expozícia oblasti nosa, maximálne trvanie expozície je možné prispôsobiť s cieľom minimalizovať druhovo špecifické utrpenie. Úroveň koncentrácie, ktorá sa použije ako počiatočná dávka, sa vyberie zo štyroch stabilných úrovní, pričom počiatočná úroveň koncentrácie by mala byť tá, pri ktorej sa pri exponovaných zvieratách s najväčšou pravdepodobnosťou vyskytne toxicita. Schémy testovania pre plyny, pary a aerosóly (vrátane schém uvedených v dodatkoch 2 – 4) predstavujú testovanie s hraničnými hodnotami kategórií CLP 1 – 4 (9) v prípade plynov (100; 500; 2 500; 20 000 ppm/4 h) (dodatok2), v prípade pár (0,5; 2; 10; 20 mg/l/4 h) (dodatok 3) a v prípade aerosólov (0,05; 0,5; 1; 5 mg/l/4 h) (dodatok 4). Kategória 5, ktorá nie je začlenená do nariadenia (ES) č. 1272/2008, (9) sa týka vyšších koncentrácií, ako sú príslušné limitné koncentrácie. Pre každú počiatočnú koncentráciu platí tá istá schéma testovania. V závislosti od počtu zvierat usmrtených humánnym spôsobom alebo uhynutých sa postup testovania uskutočňuje podľa naznačených šípok, až kým nie je možné chemikáliu kategorizovať.

26. Časový interval medzi skupinami expozícií je určený nástupom, trvaním a závažnosťou príznakov toxicity. Expozícia zvierat pri ďalšej úrovni koncentrácie by sa mala odložiť, kým sa nenadobudne dostatočná dôvera, že zvieratá, ktoré boli testované, prežijú. Medzi expozíciami pri jednotlivých úrovniach koncentrácie sa odporúča interval tri alebo štyri dni, aby sa umožnilo pozorovanie oneskorenej toxicity. Časový interval sa môže nastaviť podľa potreby, napr. v prípade nepresvedčivej reakcie.

▼M4

Limitný test

27. Limitný test sa používa, ak je známe alebo sa predpokladá, že testovaná chemikália je v podstate netoxická, t. j. vyvoláva toxickú reakciu iba pri vyššej koncentrácii, ako je regulačná limitná koncentrácia. Informácie o toxicite testovanej chemikálie možno získať z poznatkov o podobných testovaných látkach alebo podobných zmesiach pri zohľadnení identity a percenta zložiek, o ktorých je známe, že sú toxikologicky významné. V týchto situáciách, keď existuje málo informácií alebo neexistujú žiadne informácie o jej toxicite, alebo ak sa očakáva, že testovaná chemikália bude toxická, je potrebné vykonať základný test [ďalšie usmernenia sú uvedené v dokumente GD 39 (8)].

28. Podľa bežného postupu sa tri zvieratá z každého pohlavia alebo šesť zvierat vnímavejšieho pohlavia vystaví koncentrácii 20 000 ppm v prípade plynov, 20 mg/l v prípade pár a 5 mg/l v prípade prachu/hmly (ak je to možné), ktorá v rámci tejto testovacej metódy slúži ako limitný test. Pri testovaní aerosólov by hlavným cieľom malo byť dosiahnutie dýchateľnej veľkosti častíc (t. j. MMAD 1 – 4 μm). V prípade väčšiny testovaných chemikálií je túto veľkosť možné dosiahnuť pri koncentrácii 2 mg/l. O testovanie aerosólov pri vyššej koncentrácii ako 2 mg/l sa možno pokúšať, iba ak je možné získať dýchateľnú veľkosť častíc [pozri dokument GD 39 (8)]. Podľa Globálneho harmonizovaného systému (GHS) (16) sa z dôvodu starostlivosti o zvieratá neodporúča testovanie pri vyššej koncentrácii, ako je limitná koncentrácia. Testovanie v kategórii 5 systému GHS (16), ktorá nie je plne začlenená do nariadenia (ES) č. 1272/2008 (9), by sa malo zvažovať iba vtedy, ak existuje vysoká pravdepodobnosť, že výsledky takéhoto testu by mali priamy význam pre ochranu ľudského zdravia, pričom do správy o štúdii sa uvedie odôvodnenie. V prípade potenciálne výbušných testovaných chemikálií treba dbať na to, aby nenastali podmienky, ktoré by mohli viesť k výbuchu. S cieľom zabrániť zbytočnému využívaniu zvierat by sa malo pred limitným testom vykonať testovacie kolo bez zvierat, aby sa zabezpečilo, že v komore je možné dosiahnuť podmienky na účely limitného testu.

POZOROVANIA

29. Zvieratá by sa mali v priebehu trvania expozície pravidelne klinicky pozorovať. Po expozícii by sa mali klinické pozorovania vykonať najmenej dvakrát v deň expozície alebo častejšie, ak to indikuje reakcia zvierat na testovanie, a následne najmenej raz denne počas 14 dní. Dĺžka pozorovania nie je presne určená, ale mala by sa stanoviť podľa charakteru a času nástupu klinických príznakov a dĺžky obdobia zotavenia. Časy, keď sa objavia a zmiznú príznaky toxicity, sú dôležité, predovšetkým v prípade tendencie oneskorenia príznakov toxicity. Všetky pozorovania sa systematicky zaznamenávajú, pričom každé zviera má individuálny záznam. Moribundné zvieratá a zvieratá, ktoré majú silné bolesti a/alebo vykazujú pretrvávajúce príznaky silného utrpenia, by sa mali z dôvodu starostlivosti o zvieratá humánnym spôsobom utratiť. Pri vyšetrovaní klinických príznakov toxicity treba dávať pozor, aby sa počiatočný nepatrný nález a krátkodobé zmeny dýchania, ktoré sú dôsledkom expozície, nezamieňali za účinky súvisiace s aplikáciou chemikálie. Zohľadnia sa zásady a kritériá zhrnuté v Usmerňujúcom dokumente o humánnych parametroch (Humane Endpoints Guidance Document) (7). Keď sa zvieratá usmrtia z humánnych dôvodov alebo sa nájdu uhynuté, je potrebné čo možno najpresnejšie zaznamenať čas uhynutia.

▼M4

30. Pozorovania v klietkach sa zameriavajú na zmeny kože, srsti, očí, slizníc, dýchania, krvného obehu, autonómneho a centrálneho nervového systému, ako aj somatomotoriky a správania. Ak je to možné, zaznamená sa každý rozdiel medzi lokálnymi a systémovými účinkami. Pozornosť sa zameriava na pozorovanie triašky, kŕčov, slinenia, hnačky, letargie, spánku a kómy. Meraním rektálnej teploty možno získať dôkazy svedčiace o reflexnej bradypney alebo hypo/hypertermii, ktoré súvisia s testovaním alebo s obmedzením pohybu.

Telesné hmotnosti

31. Individuálne hmotnosti zvierat by sa mali zaznamenať raz počas obdobia aklimatizácie, v deň expozície pred expozíciou (deň 0), minimálne v dňoch 1, 3 a 7 (a následne raz za týždeň) a v čase uhynutia alebo utratenia, pokiaľ k nemu dôjde po dni 1. Telesná hmotnosť sa považuje za kritický ukazovateľ toxicity a zvieratá, pri ktorých nastane trvalý úbytok hmotnosti $\geq$ 20 % v porovnaní s hodnotami pred štúdiou, by sa mali pozorne sledovať. Zvieratá, ktoré prežijú, sa na konci obdobia po expozícii odvážia a humánne usmrtia.

Patológia

32. Všetky testované zvieratá vrátane tých, ktoré uhynú počas testu alebo sa utratia a vylúčia zo štúdie z dôvodu starostlivosti o zvieratá, sa podrobujú makroskopickej pitve. Ak nie je možné vykonať pitvu ihneď po objavení uhynutého zvieraťa, zviera sa schladí (nie zmrazí) na dostatočne nízku teplotu, aby sa minimalizovala autolýza. Pitvy by sa mali vykonať čo najskôr, zvyčajne v priebehu jedného alebo dvoch dní. Pri každom zvierati sa zaznamenajú všetky makroskopické patologické zmeny, pričom osobitná pozornosť sa venuje akýmkoľvek zmenám v dýchacej sústave.

33. Na účely zvýšenia výpovednej hodnoty štúdie možno zvážiť ďalšie vyšetrenia *a priori* zahrnuté od začiatku, ako je meranie hmotnosti pľúc potkanov, ktoré prežili, a/alebo poskytnutie dôkazov o podráždení prostredníctvom mikroskopického vyšetrenia dýchacej sústavy. Medzi skúmané orgány môžu patriť aj orgány, ktoré svedčia o makroskopickej patológii pri zvieratách, ktoré prežili 24 alebo viac hodín, a orgány, o ktorých je známe alebo pri ktorých sa predpokladá, že boli zasiahnuté. Mikroskopické vyšetrenie celej dýchacej sústavy môže poskytnúť užitočné informácie o testovaných chemikáliách, ktoré reagujú s vodou, ako sú kyseliny a hygroskopické testované chemikálie.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Údaje

34. Treba uviesť údaje o telesnej hmotnosti a pitevných nálezoch jednotlivých zvierat. Údaje z klinických pozorovaní sa zhrnú v podobe tabuliek, kde sa uvedie pre každú pokusnú skupinu počet použitých zvierat, počet zvierat vykazujúcich špecifické príznaky toxicity, počet zvierat, ktoré sa našli uhynuté počas testu alebo ich usmrtili z humánnych dôvodov, čas uhynutia jednotlivých zvierat, opis a časový priebeh toxických účinkov a reverzibility a pitevné nálezy.

▼M4

Správa o teste

35. Správa o teste by mala obsahovať tieto informácie:

Testované zvieratá a chov:

— opis podmienok v klietkach vrátane: počtu (alebo zmeny počtu) zvierat na klietku, výstelky, teploty prostredia a relatívnej vlhkosti, dĺžky svetlej fázy a identifikácie krmiva,

— použité druhy/kmene a odôvodnenie použitia druhov iných ako potkany,

— počet, vek a pohlavie zvierat,

— metóda randomizácie,

— údaje o kvalite krmiva a vody (vrátane druhu/zdroja krmiva, zdroja vody),

— opis akýchkoľvek podmienok pred testovaním vrátane krmiva, karantény a liečby chorôb.

Testovaná chemikália:

— fyzikálny charakter, čistota a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti (vrátane izomerizácie),

— identifikačné údaje a registračné číslo CAS (Chemical Abstract Services), ak je známe.

Nosič:

— odôvodnenie použitia nosiča a odôvodnenie výberu nosiča (ak je iný ako voda),

— historické alebo súčasné údaje preukazujúce, že nosič nemá vplyv na výsledky štúdie.

Inhalačná komora:

— opis inhalačnej komory vrátane rozmerov a objemu,

— zdroj a opis zariadenia použitého na expozíciu zvierat, ako aj na vytvorenie ovzdušia,

— zariadenie na meranie teploty, vlhkosti, veľkosti častíc a skutočnej koncentrácie,

— zdroj vzduchu, manipulácia s dodaným/extrahovaným vzduchom a použitý klimatizačný systém,

— metódy použité na kalibráciu zariadenia s cieľom zabezpečiť homogénne testovacie ovzdušie,

— rozdiel tlakov (pozitívny alebo negatívny),

— expozičné otvory na jednu komoru (v prípade expozície oblasti nosa), umiestnenie zvierat v systéme (v prípade expozície celého tela),

— dočasná homogenita/stabilita testovacieho ovzdušia,

— umiestnenie senzorov teploty a vlhkosti a odber vzorky testovacieho ovzdušia v komore,

— hodnoty prietoku vzduchu, prietok vzduchu na jeden expozičný otvor (v prípade expozície oblasti nosa) alebo množstvo zvierat na komoru (v prípade expozície celého tela),

— informácie o zariadení použitom na meranie kyslíka a oxidu uhličitého, ak sa použilo,

▼M4

— čas potrebný na dosiahnutie rovnováhy v inhalačnej komore (t_{95}),

— počet zmien objemu za hodinu,

— meracie prístroje (ak sa použili).

Údaje o expozícii:

— odôvodnenie výberu cieľovej koncentrácie pre základnú štúdiu,

— nominálne koncentrácie (celková hmotnosť testovanej chemikálie aplikovanej do inhalačnej komory vydelená objemom vzduchu, ktorý prešiel komorou),

— skutočné koncentrácie testovanej chemikálie zachytenej z dýchacej zóny zvierat, v prípade testovaných zmesí, ktoré vytvárajú heterogénne fyzikálne skupenstvá (plyny, pary, aerosóly), možno každé skupenstvo analyzovať samostatne,

— všetky koncentrácie ovzdušia sa zaznamenajú v hmotnostných jednotkách (napr. mg/l, mg/m^3 atď.), v zátvorke možno uviesť aj objemové jednotky (napr. ppm, ppb),

— rozdelenie veľkosti častíc, stredný aerodynamický hmotnostný priemer (MMAD) a štandardná odchýlka geometrického priemeru (σ_g) vrátane metód ich výpočtu. Jednotlivé analýzy veľkosti častíc sa uvedú v správe.

Podmienky testovania:

— podrobné informácie o príprave testovanej chemikálie vrátane podrobných údajov o všetkých postupoch použitých na zmenšenie veľkosti častíc tuhých látok alebo na prípravu roztokov testovanej chemikálie. V prípadoch, v ktorých v dôsledku mechanických procesov mohlo dôjsť k zmene zloženia testovanej chemikálie, sa uvedú výsledky analýzy na overenie zloženia testovanej chemikálie,

— opis (podľa možnosti spolu s nákresom) zariadenia použitého na vytvorenie testovacieho ovzdušia a na expozíciu zvierat testovaciemu ovzdušiu,

— podrobné informácie o použitej chemickej analytickej metóde a o overení metódy (vrátane účinnosti výťažnosti testovanej chemikálie z prostriedku na odber vzorky),

— odôvodnenie výberu testovacích koncentrácií.

Výsledky:

— tabuľkové spracovanie teploty, vlhkosti a prúdenia vzduchu v komore,

— tabuľkové spracovanie údajov o nominálnych a skutočných koncentráciách,

— tabuľkové spracovanie údajov o veľkosti častíc vrátane údajov o odbere vzoriek na analýzu, o rozdelení veľkosti častíc a o výpočtoch MMAD a σ_g,

— tabuľkové spracovanie získaných údajov o reakcii a úrovni koncentrácie pre každé zviera (t. j. zvieratá vykazujúce príznaky toxicity vrátane mortality, charakteru, závažnosti a trvania účinkov),

— telesné hmotnosti jednotlivých zvierat zistené počas dní štúdie, dátum a čas uhynutia, ak k nemu došlo pred plánovaným utratením, časový priebeh nástupu príznakov toxicity a skutočnosť, či tieto príznaky boli reverzibilné pre každé zviera,

▼M4

— pitevné nálezy a histopatologické nálezy pre každé zviera, ak sú k dispozícii,

— klasifikácia kategórie CLP a hraničná hodnota LC_{50}.

Rozbor a interpretácia výsledkov:

— osobitný dôraz sa kladie na opis metód použitých na splnenie kritérií tejto testovacej metódy, napr. limitnej koncentrácie alebo veľkosti častíc,

— dýchateľnosť častíc vzhľadom na celkové zistenia sa uvedie, najmä ak nebolo možné splniť kritériá na veľkosť častíc,

— konzistencia metód použitých na stanovenie nominálnej a skutočnej koncentrácie a vzťah skutočnej koncentrácie k nominálnej koncentrácii sa uvedú v celkovom hodnotení štúdie,

— uvedie sa pravdepodobná príčina uhynutia a prevládajúci druh pôsobenia (systémové či lokálne),

— uvedie sa vysvetlenie, ak bolo potrebné humánnym spôsobom utratiť zvieratá, ktoré mali bolesti alebo vykazovali príznaky silného alebo pretrvávajúceho utrpenia, v súlade s kritériami v usmerňovacom dokumente OECD o humánnych parametroch (Guidance Document on Humane Endpoints) (7).

LITERATÚRA

1. Kapitola B.2 tejto prílohy, Akútna toxicita (inhalačná).

2. Holzhütter, H.-G., Genschow, E., Diener, W., a Schlede, E. (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol*. 77: 243 – 254.

3. Diener, W., Kayser, D., a Schlede, E. (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol*. 71: 537 – 549.

4. Diener, W., a Schlede, E. (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC50 Tests. *ALTEX* 1: 129 – 134.

5. Kapitola B.1b tejto prílohy, Akútna orálna toxicita — metóda triedy akútnej toxickej.

6. OECD (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105, OECD, Paríž. K dispozícii na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

7. OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. K dispozícii na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

8. OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paríž. K dispozícii na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

9. Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1272/2008 zo 16. decembra 2008 o klasifikácii, označovaní a balení látok a zmesí, o zmene, doplnení a zrušení smerníc 67/548/EHS a 1999/45/ES a o zmene a doplnení nariadenia (ES) č. 1907/2006 (Ú. v. EÚ L 353, 31.12.2008, s. 1).

▼**M4**

10. Kapitola B.40 tejto prílohy, Poleptanie kože *in vitro*: test pomocou transkutánneho elektrického odporu (TER).

11. Kapitola B.40a tejto prílohy, Poleptanie kože *in vitro*: test pomocou modelu ľudskej kože.

12. OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paríž. K dispozícii na: [http://www.oecd.org/env/testguidelines].

13. Phalen, R. F. (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (druhé vydanie) Informa Healthcare, New York.

14. SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. Fund. Appl. Toxicol. 18: 321 – 327.

15. Pauluhn, J., a Thiel, A. (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. J. Appl. Toxicol. 27: 160 – 167

16. OSN (2007), Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemických látok (GHS), ST/SG/AC.10/30, OSN New York a Ženeva. K dispozícii na: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html].

▼**M4**

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMU

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

▼M4

Dodatok 2

Postup, ktorý treba dodržať pri každej počiatočnej koncentrácii v prípade plynov (ppm/4 h)

Všeobecné poznámky ([1])

Pri každej počiatočnej koncentrácii príslušné testovacie schémy, ako je uvedené v tejto prílohe, uvádzajú postup, ktorý je potrebné dodržiavať.

Dodatok 2a: Počiatočná koncentrácia je 100 ppm.

Dodatok 2b: Počiatočná koncentrácia je 500 ppm.

Dodatok 2c: Počiatočná koncentrácia je 2 500 ppm.

Dodatok 2d: Počiatočná koncentrácia je 20 000 ppm.

V závislosti od počtu zvierat usmrtených humánnym spôsobom alebo uhynutých sa postup testovania uskutočňuje podľa naznačených šípok.

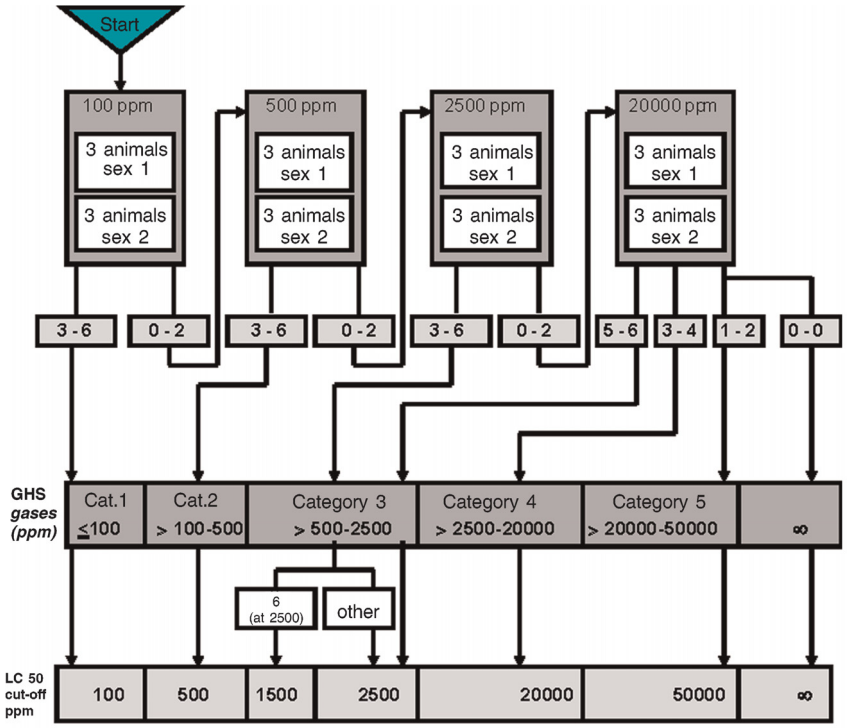
([1]) V týchto tabuľkách je uvedený odkaz na GHS (Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemických látok). Ekvivalentom na úrovni EÚ je nariadenie (ES) č. 1272/2008. V prípade akútnej inhalačnej toxicity nie je v nariadení (ES) č. 1272/2008 (9) zahrnutá kategória 5.

▼M4

Dodatok 2a

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 100 ppm/4 h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

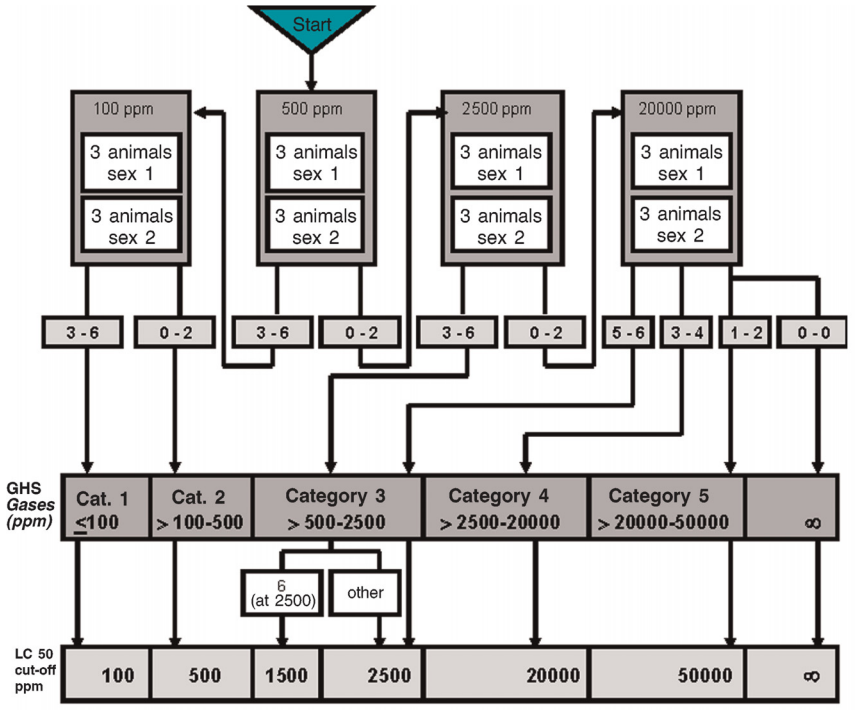
— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Dodatok 2b

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 500 ppm/4h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

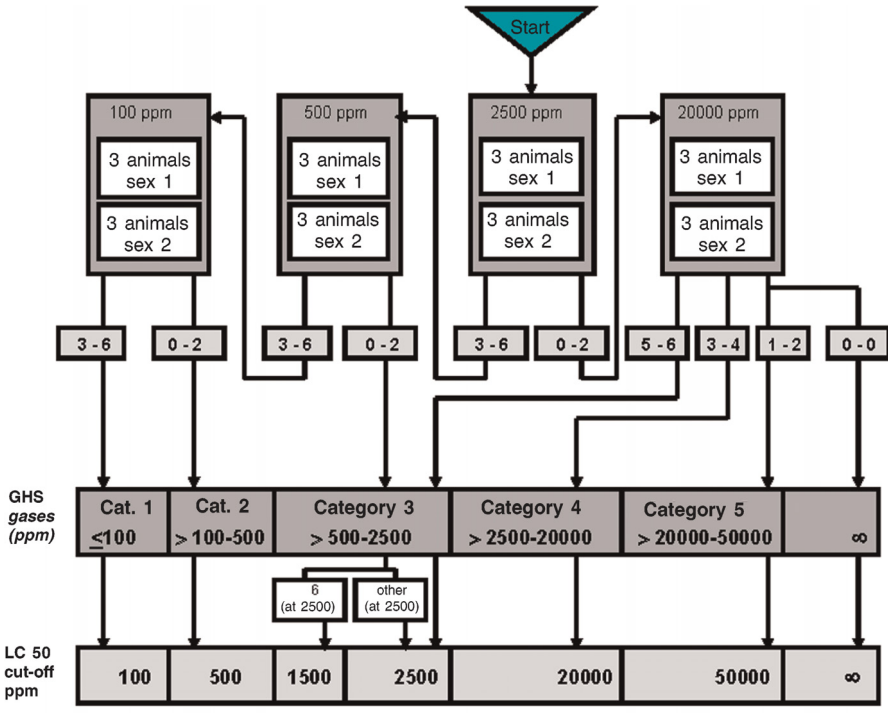
— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Dodatok 2c

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 2 500 ppm/4h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0–6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

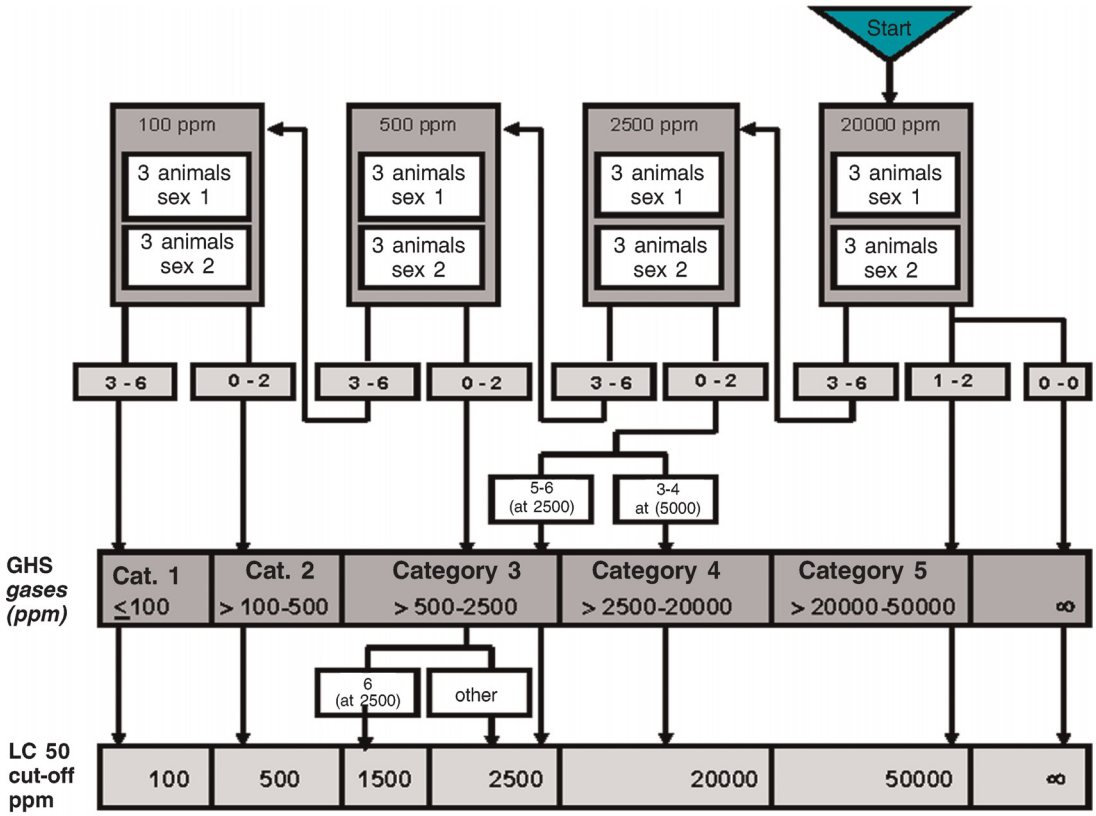
— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Dodatok 2d

Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 20 000 ppm/4h for gases



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

— Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Dodatok 3

Postup, ktorý treba dodržať pri každej počiatočnej koncentrácii v prípade pár (mg/L/4 h)

Všeobecné poznámky ([1])

Pri každej počiatočnej koncentrácii príslušné testovacie schémy, ako je uvedené v tejto prílohe, uvádzajú postup, ktorý je potrebné dodržiavať.

Dodatok 3a: Počiatočná koncentrácia je 0,5 mg/l.

Dodatok 3b: Počiatočná koncentrácia je 2,0 mg/l.

Dodatok 3c: Počiatočná koncentrácia je 10 mg/l.

Dodatok 3d: Počiatočná koncentrácia je 20 mg/l.

V závislosti od počtu zvierat usmrtených humánnym spôsobom alebo uhynutých sa postup testovania uskutočňuje podľa naznačených šípok.

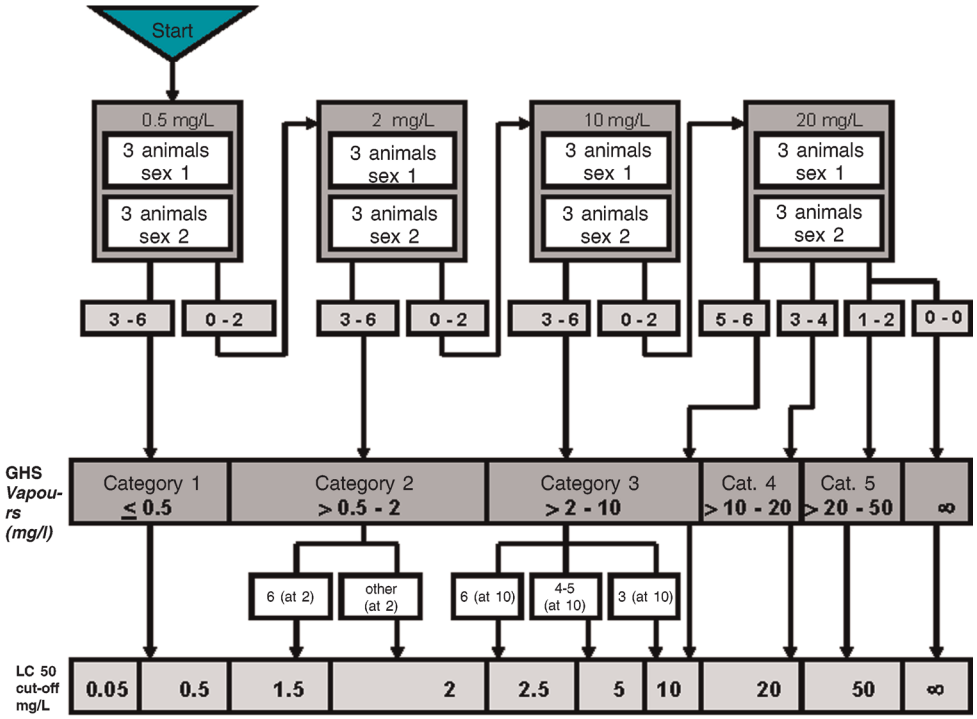
([1]) V týchto tabuľkách je uvedený odkaz na GHS (Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemických látok). Ekvivalentom na úrovni EÚ je nariadenie (ES) č. 1272/2008. V prípade akútnej inhalačnej toxicity nie je v nariadení (ES) č. 1272/2008 (9) zahrnutá kategória 5.

▼M4

Dodatok 3a

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0.5 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

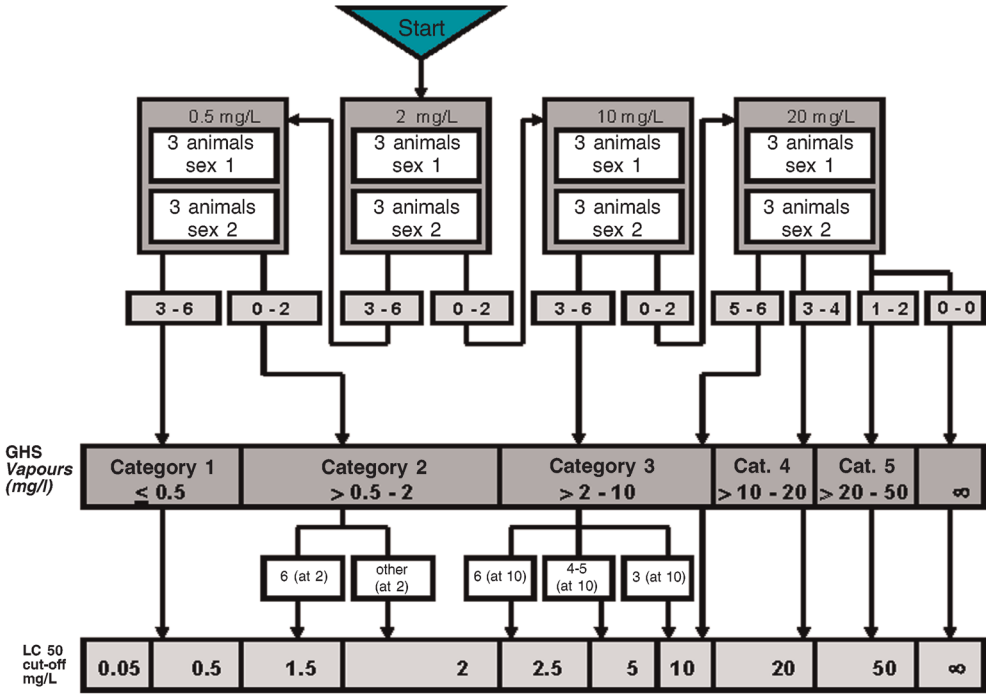
— Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Dodatok 3b

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 2 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0–6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

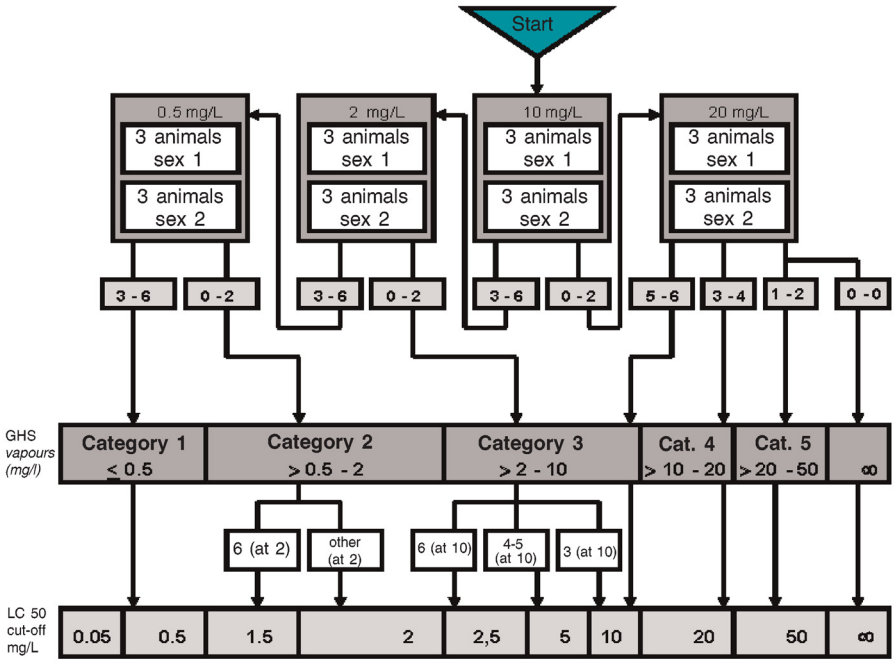
— Testing at 50 mg/L4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Dodatok 3c

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 10 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used pers step

— 0–6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

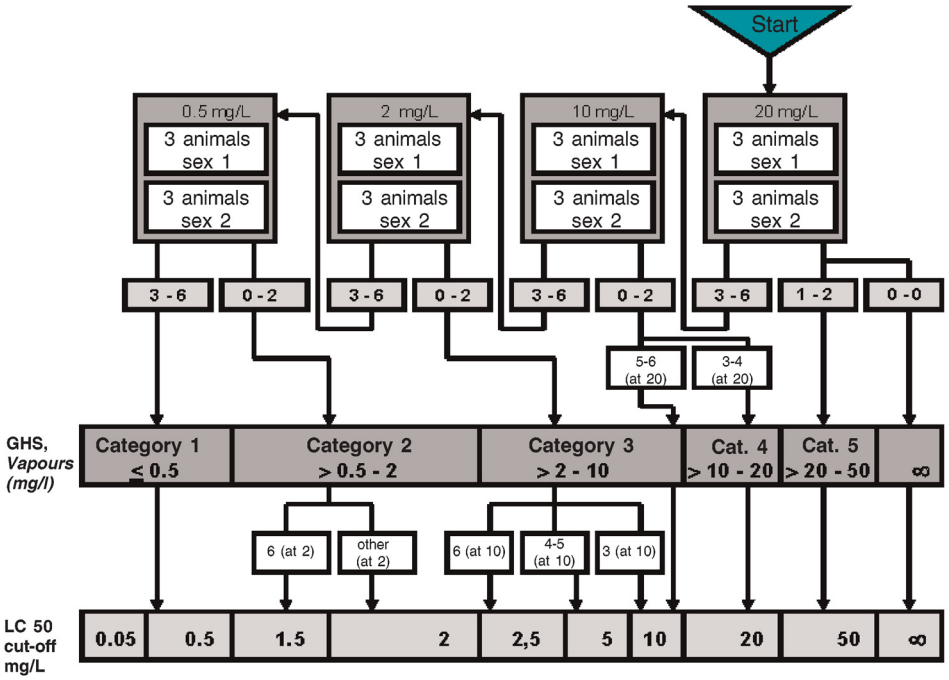
— Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Dodatok 3d

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 20 mg/L/4h for vapours



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

— Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39(8)

▼M4

Dodatok 4

Postup, ktorý treba dodržať pri každej počiatočnej koncentrácii v prípade aerosólov (mg/L/4 h)

Všeobecné poznámky ([1])

Pri každej počiatočnej koncentrácii príslušné testovacie schémy, ako je uvedené v tejto prílohe, uvádzajú postup, ktorý je potrebné dodržiavať.

Dodatok 4a: Počiatočná koncentrácia je 0,05 mg/l.

Dodatok 4b: Počiatočná koncentrácia je 0,5 mg/l.

Dodatok 4c: Počiatočná koncentrácia je 1 mg/l.

Dodatok 4d: Počiatočná koncentrácia je 5 mg/l.

V závislosti od počtu zvierat usmrtených humánnym spôsobom alebo uhynutých sa postup testovania uskutočňuje podľa naznačených šípok.

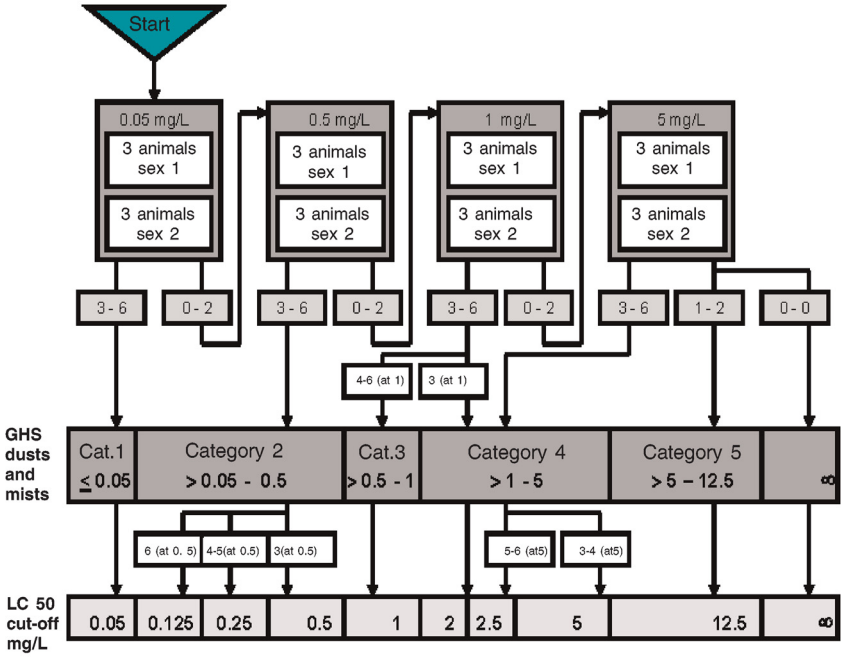
([1]) V týchto tabuľkách je uvedený odkaz na GHS (Globálny harmonizovaný systém klasifikácie a označovania chemických látok). Ekvivalentom na úrovni EÚ je nariadenie (ES) č. 1272/2008. V prípade akútnej inhalačnej toxicity nie je v nariadení (ES) č. 1272/2008 (9) zahrnutá kategória 5.

▼M4

Dodatok 4a

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0,05 mg/L/4h for vapours



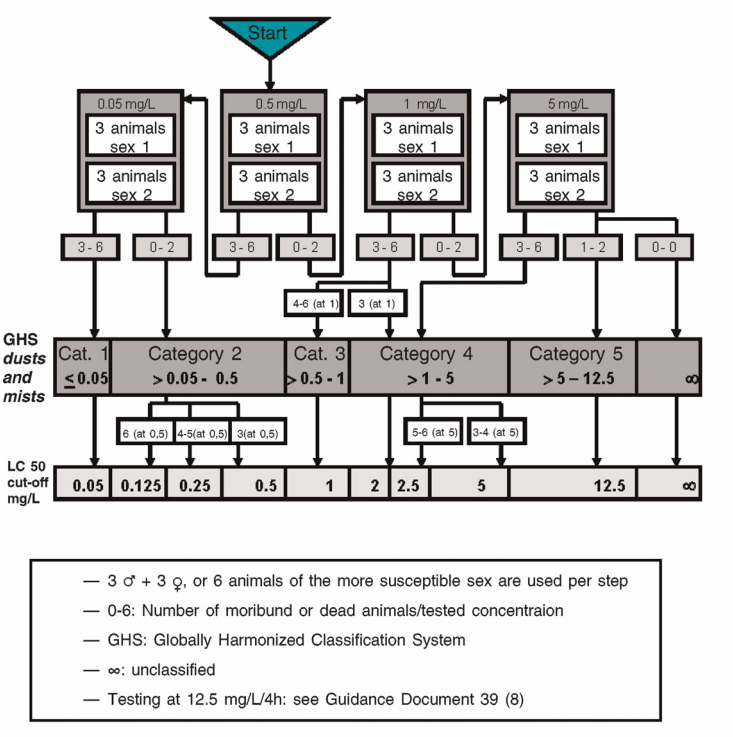
— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: unclassified
— Testing at 12.5 mg/L4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Dodatok 4b

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0,5 mg/L/4h for aerosols



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step

— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion

— GHS: Globally Harmonized Classification System

— ∞: unclassified

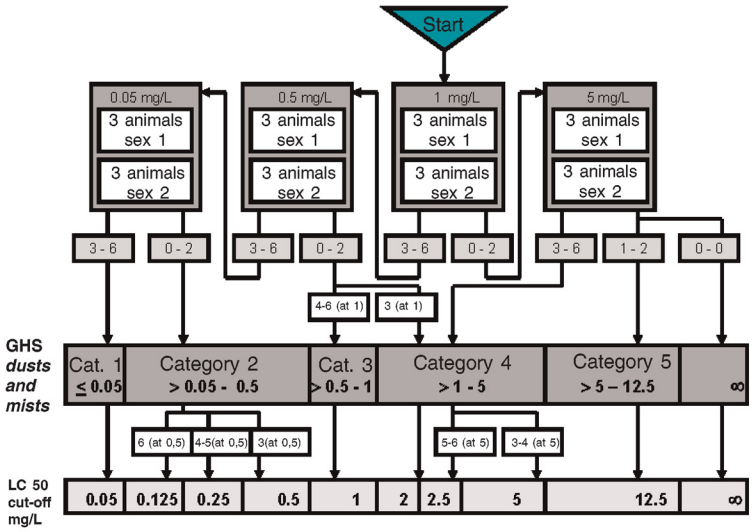
— Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Dodatok 4c

Acute inhalation toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 1 mg/L/4h for aerosols



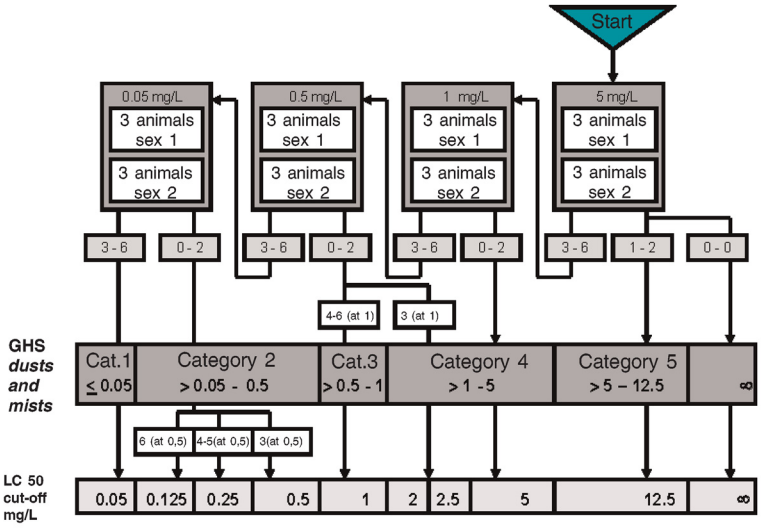
— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
— 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentraion
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: unclassified
— Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

▼M4

Dodatok 4d

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 5 mg/L/4h for aerosols



— 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
— 0-6 : Number of moribund or dead animals/tested concentraion
— GHS: Globally Harmonized Classification System
— ∞: unclassified
— Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)“

▼B

ČASŤ C: METÓDY NA STANOVENIE EKOTOXICITY

OBSAH

C.1. AKÚTNA TOXICITA NA RYBÁCH

C.2. TEST AKÚTNEJ IMOBILIZÁCIE DAFNIÍ *(DAPHNIA* SP.)

C.3. SLADKOVODNÉ RIASY A SINICE, TEST INHIBÍCIE RASTU

C.4. STANOVENIE „ĽAHKEJ“ BIODEGRADOVATEĽNOSTI

ČASŤ I. VŠEOBECNÉ ÚVAHY

ČASŤ II. ÚBYTOK ROZPUSTENÉHO ORGANICKÉHO UHLÍKA (DOC DIE-AWAY) (metóda C.4-A)

ČASŤ III. MODIFIKOVANÝ SKRÍNINGOVÝ TEST OECD (metóda C.4-B)

ČASŤ IV. VÝVOJ OXIDU UHLIČITÉHO (CO_2) (metóda C.4-C)

ČASŤ V. TEST MANOMETRICKEJ RESPIROMETRIE (metóda C.4-D)

ČASŤ VI. TEST UZAVRETEJ FĽAŠE (metóda C.4-E)

ČASŤ VII. TEST M.I.T.I. (metóda C.4-F)

C.5. DEGRADÁCIA – BIOCHEMICKÁ SPOTREBA KYSLÍKA

C.6. DEGRADÁCIA – CHEMICKÁ SPOTREBA KYSLÍKA

C.7. DEGRADÁCIA – ABIOTICKÁ DEGRADÁCIA: HYDROLÝZA AKO FUNKCIA pH

C.8. TOXICITA NA DÁŽĎOVKÁCH

C.9. BIODEGRADÁCIA – ZAHN-WELLENSOV TEST

C.10. SIMULAČNÝ TEST AERÓBNEHO ČISTENIA ODPADOVÝCH VÔD C.10-A: JEDNOTKY S TECHNOLÓGIOU AKTIVOVANÉHO KALU – C.10-B: BIOFILMY

C.11. BIODEGRADÁCIA – TEST RESPIRAČNEJ INHIBÍCIE AKTIVOVANÉHO KALU

C.12. BIODEGRADÁCIA – MODIFIKOVANÝ SCAS-TEST

C.13. BIOKONCENTRÁCIA: PRIETOKOVÝ RYBÍ TEST

C.14. RASTOVÝ TEST MLÁĎAT RÝB

C.15. RYBY, KRÁTKODOBÝ TEST TOXICITY NA EMBRYÁCH A VÝVOJOVOM ŠTÁDIU PLODOVÉHO VAKU

C.16. VČELY OBECNÉ – AKÚTNY TEST ORÁLNEJ TOXICITY

C.17. VČELY OBECNÉ – AKÚTNY TEST TOXICITY KONTAKTOM

C.18. ADSORPCIA ALEBO DESORPCIA S POUŽITÍM ROVNOVÁŽNEJ METÓDY DÁVKOVANIA

▼B

C.19.	ODHAD ADSORPČNÉHO KOEFICIENTU (K_{oc}) V PÔDE A V SPLAŠKOVOM KALE ZA POUŽITIA VYSOKOÚČINNEJ KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE (HPLC)
C.20.	REPRODUKČNÝ TEST NA *DAPHNIA MAGNA*
C.21.	PÔDNE MIKROORGANIZMY: TEST TRANSFORMÁCIE DUSÍKA
C.22.	PÔDNE MIKROORGANIZMY: TRANSFORMAČNÝ TEST UHLÍKA
C.23.	AERÓBNA A ANAERÓBNA TRANSFORMÁCIA V PÔDE
C.24.	AERÓBNA A ANAERÓBNA TRANSFORMÁCIA V SYSTÉMOCH VODA/SEDIMENT
C.25.	AERÓBNA MINERALIZÁCIA V POVRCHOVEJ VODE – SIMULAČNÝ TEST BIODEGRADÁCIE
C.26.	*LEMNA* SP. TEST INHIBÍCIE RASTU

▼M4

C.27.	TEST TOXICITY CHIRONOMIDAE V SYSTÉME SEDIMENT – VODA ZA POUŽITIA OBOHATENÉHO SEDIMENTU
C.28.	TEST TOXICITY CHIRONOMIDAE V SYSTÉME SEDIMENT – VODA ZA POUŽITIA OBOHATENEJ VODY
C.29.	ĽAHKÁ BIODEGRADOVATEĽNOSŤ – CO_2 V HERMETICKY UZAVRETÝCH NÁDOBÁCH (TEST V UZAVRETOM PRIESTORE NAD KVAPALINOU)
C.30.	BIOAKUMULÁCIA PRI SUCHOZEMSKÝCH MÁLOŠTETINAVCOCH

▼B

C.1. AKÚTNA TOXICITA NA RYBÁCH

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Účelom tohto testu je stanoviť akútnu letálnu toxicitu látky pre ryby v sladkej vode. Tak ako je to len možné, je výhodné mať informácie o rozpustnosti vo vode, tlaku pár, chemickej stabilite, disociačných konštantách a biodegradabilite látky, aby tieto informácie pomohli pri výbere najvhodnejšej skúšobnej metódy (statická, semistatická alebo prietoková), ktorá uspokojivo zaistí konštantné koncentrácie testovanej látky počas testu.

Ďalšie informácie (napr. štruktúrny vzorec, stupeň čistoty, druh a percentuálne zastúpenie nečistôt, prítomnosť a množstvo aditív a rozdeľovaci koeficient n-oktanol/voda) sa tiež berú do úvahy pri plánovaní testu a pri vyhodnotení výsledkov.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Akútna toxicita je rozpoznateľný nepriaznivý účinok indukovaný v organizme počas krátkeho času (dni) expozície látke. V tomto teste je akútna toxicita vyjadrená ako stredná letálna koncentrácia (LC_{50}), čo je taká koncentrácia vo vode, pri ktorej uhynie 50 % rýb z testovaného súboru počas kontinuálnej expozície, ktorá musí byť predtým určená.

Všetky koncentrácie testovanej látky sú uvedené v hmotnosti na objem (mg/liter). Môžu byť tiež vyjadrené ako hmotnosť na hmotnosť ($mg.kg^{-1}$).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky sa môžu testovať na účely demonštrovania, že za laboratórnych skúšobných podmienok nedošlo k významnej zmene reakcie testovaných druhov.

Pre tento test nie sú špecifikované žiadne referenčné látky.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Limitný test možno vykonať pri koncentrácii 100 mg/liter na dôkaz, že hodnota LC_{50} je väčšia ako táto koncentrácia.

Ryby sú exponované testovanej látke pridanej do vody v rozsahu rôznych koncentrácií počas 96 hodín. Úmrtnosť sa zaznamenáva minimálne v 24-hodinových intervaloch, a ak je to možné, koncentrácie spôsobujúce 50 % úmrtnosť rýb (LC_{50}) sa vypočítajú v každom pozorovacom čase.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Kritériá kvality sa aplikujú pri limitnom teste, ako aj pri úplnej skúšobnej metóde.

Úmrtnosť v kontrolách nesmie presiahnuť 10 % (alebo jednu rybu, ak sa použilo menej ako 10 rýb) na konci testu.

Koncentrácia rozpusteného kyslíka musí byť vyššia ako 60 % z celkovej hodnoty pri saturácii vzduchom.

▼B

Koncentrácie testovanej látky sa budú udržiavať v rámci 80 % pôvodných koncentrácií počas celého testu.

Pre látky, ktoré sú ľahko rozpustné v testovacom médiu a ktoré tvoria stabilné roztoky, napríklad tie, ktoré nebudú vo významnej miere prchavé, nebudú sa rozkladať, hydrolyzovať ani adsorbovať, ich počiatočná koncentrácia sa môže považovať za ekvivalentnú k nominálnej koncentrácii. Musí byť dokázané, že koncentrácie sa udržiavali počas celého testu a kritériá kvality sa dodržali.

Pre látky, ktoré sú:

i) slabo rozpustné v testovacom médiu alebo

ii) schopné vytvárať stabilné emulzie alebo disperzie, alebo

iii) nestabilné vo vodných roztokoch,

počiatočná koncentrácia sa bude považovať za koncentráciu meranú v roztoku (alebo ak to nie je technicky možné, meranú vo vodnom stĺpci) na začiatku testu. Koncentrácia sa stanoví až po vytvorení rovnováhy, ale pred použitím testovaných rýb.

Vo všetkých týchto prípadoch sa musia vykonať ďalšie merania počas testu, aby sa potvrdili aktuálne expozičné koncentrácie alebo aby sa dodržali kritériá kvality.

Hodnota pH by sa nemala meniť viac ako v rozsahu jednej jednotky.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY

Môžu sa použiť tri typy postupov:

Statický test:

Test toxicity, v ktorom nedochádza k žiadnemu toku testovaného roztoku. (Roztoky zostávajú nezmenené počas trvania testu.)

Semistatický test:

Test bez toku testovaného roztoku, ale s pravidelnými obnoveniami testovaných roztokov po určitom období (napr. 24 hodinách).

Prietokový test:

Test toxicity, v ktorom sa voda neustále obnovuje v skúšobných komorách a testovaná látka alebo prípravok sa transportuje vodou používanou na obnovu skúšobného média.

1.6.1. **Reagenty**

1.6.1.1. *Roztoky testovaných látok*

Zásobné roztoky požadovanej sily sa pripravia rozpustením látky v deionizovanej vode alebo vode podľa 1.6.1.2.

Zvolené koncentrácie na testovanie sa pripravia zriedením zásobného roztoku. Ak sa testujú vysoké koncentrácie, potom sa látka môže rozpustiť priamo vo vode.

▼B

Látky by sa normálne mali testovať len po limit rozpustnosti. Pri niektorých látkach (napr. látky s nízkou rozpustnosťou vo vode alebo vysokou hodnotou P_{OW} alebo tie, ktoré sú schopné tvoriť stabilné disperzie namiesto pravých roztokov vo vode) je prijateľné testovať koncentrácie nad limitom rozpustnosti látky, aby sa zaistilo, že bola dosiahnutá maximálna rozpustná/stabilná koncentrácia. Avšak je dôležité, aby táto koncentrácia nejakým spôsobom nenarušovala testovací systém (napr. film látky na povrchu vody, ktorý bráni oxidácii vody atď.).

Ultrazvuková disperzia, organické rozpúšťadlá, emulzifikátory alebo dispergujúce látky možno použiť ako pomôcku pri príprave zásobných roztokov látok s nízkou rozpustnosťou vo vode alebo ako pomôcku pri dispergovaní týchto látok v testovacom médiu. Keď sa použijú takéto pomocné látky, potom všetky testované koncentrácie majú obsahovať rovnaké množstvo pomocnej látky a mala by sa vykonať dodatočná kontrola, pri ktorej sú ryby vystavené rovnakej koncentrácii pomocnej látky, aká je použitá v skúšobných sériách. Koncentrácia takýchto pomocných látok by mala byť minimalizovaná, ale v žiadnom prípade by nemala presahovať 100 mg/liter skúšobného média.

Test je potrebné vykonať bez úpravy pH. Ak dochádza k výraznej zmene pH, odporúča sa, aby sa test zopakoval s úpravou pH a výsledky sa zaznamenali. V takomto prípade by sa nemala úprava pH hodnoty zásobného roztoku podľa pH hodnoty vodného roztoku, pokiaľ na to nie je špeciálny dôvod, urobiť. Na tento účel sa odporúča HCl a NaOH. Nadstavenie pH hodnoty je potrebné vykonať takým spôsobom, aby sa koncentrácia testovanej látky v zásobnom roztoku významne nezmenila. Akúkoľvek chemickú reakciu alebo fyzikálnu precipitáciu testovanej látky alebo prípravku počas úpravy hodnoty pH je potrebné uviesť v záznamoch v správe z testu.

1.6.1.2. *Voda pre chov rýb a na riedenie*

Môže sa použiť pitná voda (nekontaminovaná potenciálne škodlivou koncentráciou chlóru, ťažkými kovmi alebo inými látkami), prírodná voda dobrej kvality alebo rekonštituovaná voda (pozri dodatok I). Odporúča sa použiť vodu s celkovou tvrdosťou v rozsahu 10 až 250 mg/liter (ako $CaCO_3$) a s pH hodnotou v rozmedzí 6,0 až 8,5.

1.6.2. **Prístroje**

Všetky prístroje musia byť vyrobené z chemicky inertného materiálu.

— automatický zrieďovací systém (pre prietokový test),

— prístroj na meranie koncentrácie kyslíka,

— zariadenie na stanovenie tvrdosti vody,

— adekvátny prístroj na kontrolu teploty,

— pH meter.

1.6.3. **Testované ryby**

Ryby by mali byť zdravé a bez akýchkoľvek zjavných znetvorení.

▼B

Druh rýb sa vyberie len na základe praktických kritérií, ako je ich dobrá dostupnosť počas celého roka, vhodné udržiavanie, vhodnosť na testovanie, relatívna citlivosť na látky alebo prípravky, ako aj každý ekonomický, biologický alebo ekologický faktor, ktorý má nejaký význam. Potrebu porovnateľnosti získaných údajov a existujúcu medzinárodnú harmonizáciu (odkaz 1) je tiež nutné brať do úvahy pri výbere druhu rýb.

Zoznam druhov rýb, ktoré sa odporúčajú pre tento test, je uvedený v dodatku 2; odporúčanými druhmi sú dánio pruhované a pstruh dúhový.

1.6.3.1. *Chov*

Testované ryby majú byť z jednej zásoby podobnej dĺžky a veku. Musia sa udržiavať najmenej 12 dní za týchto podmienok:

dávkovanie:

vhodné pre systém (recirkulácia alebo prietok) a druh rýb,

voda:

pozri 1.6.1.2,

svetlo:

12 až 16 hodín osvetlenia denne,

koncentrácia rozpusteného kyslíka:

najmenej 80 % hodnoty nasýtenia vzdušným kyslíkom,

kŕmenie:

trikrát za týždeň alebo denne, s prerušením 24 hodín pred začiatkom testu.

1.6.3.2. *Úmrtnosť (mortalita)*

Po 48-hodinovej počiatočnej perióde sa zaznamenáva úmrtnosť, pričom sa aplikujú tieto kritériá:

— viac ako 10 % populácie v priebehu siedmich dní:

zrušenie celej násady,

— medzi 5 % až 10 % populácie:

udržiavacia perióda sa predĺži o ďalších sedem dní.

Ak nedôjde k ďalším úmrtiam, násada je prijateľná, inak sa zruší,

— menej ako 5 % populácie:

násada je prijateľná.

1.6.4. **Adaptácia**

Predtým, ako sa ryby použijú v teste, musia sa adaptovať aspoň sedem dní na vodu tej istej kvality a teploty, aká sa použije pri teste.

▼B

1.6.5. **Testovací postup**

Definitívnemu testovaniu môže predchádzať vyhľadávací test, aby sa získala informácia o rozsahu koncentrácií, ktoré sa použijú v hlavnom teste.

Vykonáva sa jedna kontrola bez testovanej látky, a ak je to možné, tiež sa vykonáva jedna kontrola obsahujúca pomocnú látku, navyše k testovaným sériám.

V závislosti od fyzikálnych a chemických vlastností testovanej látky alebo prípravku sa vyberie statický, semistatický alebo prietokový test ako vhodný, tak aby spĺňal kritériá kvality.

Ryby sú exponované látke tak, ako je uvedené nižšie:

— trvanie: 96 hodín,

— počet zvierat: aspoň 7 na každú koncentráciu,

— nádrže: vhodnej kapacity vo vzťahu k odporučenej náplni,

— dávkovanie: maximálne dávkovanie 1 g/liter sa odporúča pre statický a semistatický test, pri prietokovom systéme je prijateľné aj vyššie dávkovanie,

— testovaná koncentrácia: aspoň päť koncentrácií líšiacich sa konštantným faktorom nepresahujúcim 2,2 a tak, ako je to možné, zaberajúcich rozsah od 0 % do 100 % úmrtnosti,

— voda: pozri 1.6.1.2,

— svetlo: 12 až 16 hodín osvetlenia denne,

— teplota: vhodná pre príslušný druh (pozri dodatok 2), ale len v rozsahu ± 1 °C pre každý jednotlivý test,

— koncentrácia rozpusteného kyslíka: nie menej ako 60 % hodnoty nasýtenia vzdušným kyslíkom pri danej teplote,

— kŕmenie: žiadne.

Ryby sa skontrolujú po prvých 2 až 4 hodinách a v 24-hodinových intervaloch. Ryby sa považujú za mŕtve, ak nevykazujú žiadnu reakciu po dotyku na chvostovú stopku a nie sú viditeľné žiadne dýchacie pohyby. Mŕtve ryby sa odstránia a zaznamená sa úmrtnosť. Zaznamenávajú sa aj viditeľné abnormality (napr. strata rovnováhy, zmeny v plávaní, zmeny v dýchaní, pigmentácia atď.).

Denne sa musí vykonať meranie pH, rozpusteného kyslíka a teploty.

Limitný test

Pri použití postupov opísaných v tejto metóde limitný test sa môže vykonať pri koncentrácii 100 mg/l, aby sa demonštrovalo, že LC_{50} je väčšia ako táto koncentrácia.

Ak sú vlastnosti látky také, že sa nemôže dosiahnuť koncentrácia 100 mg/liter v testovanom roztoku, limitný test sa vykoná pri koncentrácii rovnej rozpustnosti látky (alebo pri maximálnej koncentrácii, pri ktorej dochádza k tvorbe stabilnej disperzie) v použitom médiu (pozri tiež bod 1.6.1.1).

▼B

Limitný test by sa mal vykonať použitím 7 až 10 rýb s rovnakým počtom rýb v kontrole. (Z binomickej teórie vyplýva, že pri použití 10 rýb s nulovou úmrtnosťou je 99,9 % spoľahlivosť, že LC_{50} je väčšia ako koncentrácia použitá v limitnom teste. Pri 7, 8 alebo 9 rybách za nulovej úmrtnosti je prinajmenšom 99 % spoľahlivosť, že LC_{50} je väčšia ako použitá koncentrácia.)

Pri výskyte úmrtnosti sa musí vykonať kompletná štúdia. Ak sa pozorujú subletálne účinky, tieto by sa mali zaznamenať.

2. **ÚDAJE A VYHODNOTENIE**

Pre každú periódu expozície, keď boli zapísané pozorovania (24, 48, 72 a 96 hodín), sa zaznamenáva percentuálna úmrtnosť oproti príslušnej koncentrácii na semilogaritmickom papieri.

Keď je to možné, pre každý pozorovací čas by sa mali odhadnúť LC_{50} a limity spoľahlivosti ($p = 0,05$) použitím štandardných postupov, tieto hodnoty sa zaokrúhlia na jedno alebo väčšinou dve platné číslice (príklady zaokrúhlenia na dve číslice: 173,5 na 170, 0,127 na 0,13 a 1,21 na 1,2).

V tých prípadoch, keď sklon krivky koncentrácia/percentá je príliš strmý a neumožňuje výpočet LC_{50}, stačí grafický odhad tejto hodnoty.

Keď v dvoch po sebe nasledujúcich koncentráciách v pomere 2,2 dochádza len k 0 % a 100 % úmrtnosti, tieto dve hodnoty stačia na indikovanie rozsahu, do ktorého patrí LC_{50}.

Ak sa pozoruje, že nemožno udržať stabilitu ani homogenitu testovanej látky, toto by sa malo zaznamenať a výsledky by sa mali interpretovať so zvýšenou pozornosťou.

3. **SPRÁVA**

Správa z testu by mala, pokiaľ je to možné, obsahovať tieto informácie:

— informácie o testovaných rybách (vedecký názov, kmeň, dodávateľ, predbežné ošetrenie, veľkosť a počet rýb použitých pri každej testovanej koncentrácii),

— zdroj vody a jej hlavné chemické charakteristiky (pH, tvrdosť, teplota),

— v prípade látky s nízkou rozpustnosťou metódy prípravy zásobného a skúšobného roztoku,

— koncentráciu všetkých pomocných látok,

— zoznam použitých koncentrácii a všetky dostupné informácie týkajúce sa stability testovanej látky alebo prípravku pri daných koncentráciách v testovanom roztoku,

— použité metódy a získané výsledky, ak sa vykonala analýza látky alebo prípravku,

— výsledky limitného testu, ak sa vykonal,

— dôvody na výber testu a detaily použitého skúšobného postupu (napr. statický, semi-statický, dávkovanie, informácia o prevzdušňovaní, dávkovanie rýb a pod.),

▼B

— opis skúšobného zariadenia,

— režim osvetlenia,

— koncentráciu rozpusteného kyslíka, pH hodnoty a teploty skúšobných roztokov každých 24 hodín,

— dôkaz, že boli splnené kritériá kvality,

— tabuľku uvádzajúcu kumulatívnu úmrtnosť pri každej koncentrácii a kontrolu (a tiež kontrolu s pomocnou látkou, ak je to potrebné) pri všetkých odporučených pozorovacích časoch,

— graf závislosti koncentrácia/percentá na konci testu,

— ak je to možné, hodnoty LC_{50} pri každom z odporučených pozorovacích časov (s 95 % limitom spoľahlivosti),

— štatistické postupy použité pri stanovení hodnôt LC_{50},

— výsledky získané s referenčnou látkou, ak sa použila;

— najvyššiu testovanú koncentráciu nespôsobujúcu úmrtnosť počas celého testu,

— najnižšiu testovanú koncentráciu spôsobujúcu 100 % úmrtnosť počas celého testu.

4. **ODKAZY**

(1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 203, Decision of the Council C(81) 30 final and updates.

(2) AFNOR – Determination of the acute toxicity of a substance to *Brachydanio rerio* – Static and Flow Through methods – NFT 90-303 June 1985.

(3) AFNOR – Determination of the acute toxicity of a substance to *Salmo gairdneri* – Static and Flow Through methods – NFT 90-305 June 1985.

(4) ISO 7346/1,/2 and/3 – Water Quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a fresh water fish (Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan – Teleostei, Cyprinidae). Part 1: Static method. Part 2: Semi-static method. Part 3: Flow-through method.

(5) Eidgenössisches Department des Innern, Schweiz: Richtlinien fur Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden – Part II 1974.

(6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L 1) und L(15).

(7) JIS K 0102, Acute toxicity test for fish.

(8) NEN 6506 – Water – Bepaling van de akute toxiciteit met behulp van *Poecilia reticulata*, 1980.

(9) Environmental Protection Agency, Methods for the acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates and amphibians. The Commitee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.

(10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

▼B

(11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.

(12) Standard methods for the examination of water and wastewater, fourteen edition, APHA-AWWAWPCF, 1975.

(13) Commission of the European Communities, Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.

(14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen fur die okotoxikologische Bewerrung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.

(15) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method for evaluating dose effects experiments, J. Pharm. Exp. Therap., 1949, vol. 96, 99.

(16) Finney, D. J. Statistical Methods in Biological Assay. Griffin, Weycombe, U.K., 1978.

(17) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. Bioassay methods for acute toxicity. Water Res., 1969, vol. 3, 793–821.

(18) Sprague, J. B. Measurement of pollutant toxicity to fish. II Utilising and applying bioassay results. Water Res., 1970, vol. 4, 3 – 32.

(19) Stephan, C. E. Method for calculating an LC_{50} Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F. I. Mayer and J. L. Hamelink). American Society for Testing and Materials, ASTM STP 634, 1977, 65 – 84.

(20) Stephan, C. E., Busch, K. A., Smith, R., Burke, J. and Andrews, R. W. A computer program for calculating an LC_{50} US EPA.

▼B

Dodatok 1

Rekonštituovaná voda

Príklad vhodnej rozpúšťacej vody

Všetky chemické látky musia byť analytickej čistoty.

Voda má byť destilovaná, dobrej kvality alebo deionizovaná s vodivosťou menej ako 5 μScm^{-1}.

Prístroj na destiláciu vody nesmie obsahovať žiadne časti vyrobené z medi.

Zásobné roztoky

$CaCl_2.2H2O$ (dihydrát chloridu vápenatého):	11,76 g
Rozpustite vo vode a doplňte vodou na 1 liter.	
$MgS0_4.7H2O$ (heptahydrát síranu horečnatého):	4,93 g
Rozpustite vo vode a doplňte vodou na 1 liter.	
$NaHCO_3$ (hydrouhličitan sodný):	2,59 g
Rozpustite vo vode a doplňte vodou na 1 liter.	
KCl (chlorid draselný):	0,23 g
Rozpustite vo vode a doplňte vodou na 1 liter.	

Rekonštituovaná rozpúšťacia voda

Zmiešajte 25 ml z každého zo štyroch zásobných roztokov a doplňte do 1 litra vodou.

Prevzdušňujte, pokiaľ sa koncentrácia rozpusteného kyslíka nebude rovnať koncentrácii nasýtenia vzdušným kyslíkom.

Hodnota pH by mala byť 7,8 ± 0,2.

Ak je to potrebné, upravte pH s NaOH (hydroxidom sodným) alebo s HCl (kyselinou chlorovodíkovou).

Takto pripravená rozpúšťacia voda sa nechá stáť asi 12 hodín a nesmie sa ďalej prevzdušňovať.

Celkové množstvo Ca a Mg iónov v tomto roztoku je 2,5 mmol na liter. Pomer Ca: Mg iónov je 4: 1 a pomer Na: K iónov je 10: 1. Celková alkalita roztoku je 0,8 mmol na liter.

Žiadna odchýlka pri príprave rozpúšťacej vody nesmie zmeniť zloženie ani vlastnosti vody.

▼B

Dodatok 2

Druhy rýb odporučených na testovanie

Odporučený druh	Odporučený rozsah teplôt pri teste(^{o} C)	Odporučená celková dĺžka rýb (cm)
Brachydanio rerio (Teleostei, Cyprinidae) (Hamilton – Buchanan), danio pruhované	20 až 24	3,0 ± 0,5
Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque), Fathead minnow	20 až 24	5,0 ± 2,0
Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linneaus 1758), kapor obyčajný	20 až 24	6,0 ± 2,0
Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) Cyprinodontidae (Tomminck a Schlegel 1850), halančík japonský	20 až 24	3,0 ± 1,0
Poecilia reticulata (Teleostei, Poeciliidae) (Peters 1859), pávie očko	20 až 24	3,0 ± 1,0
Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque, Linneanus 1758), slnečnica modrá	20 až 24	5,0 ± 2,0
Onchorhynchus mykiss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum 1988), pstruh dúhový	12 až 17	6,0 ± 2,0
Leuciscus idus (Teleostei, Cyprinidae) (Linneanus 1758), jalec zlatý	20 až 24	6,0 ± 2,0

Získavanie rýb

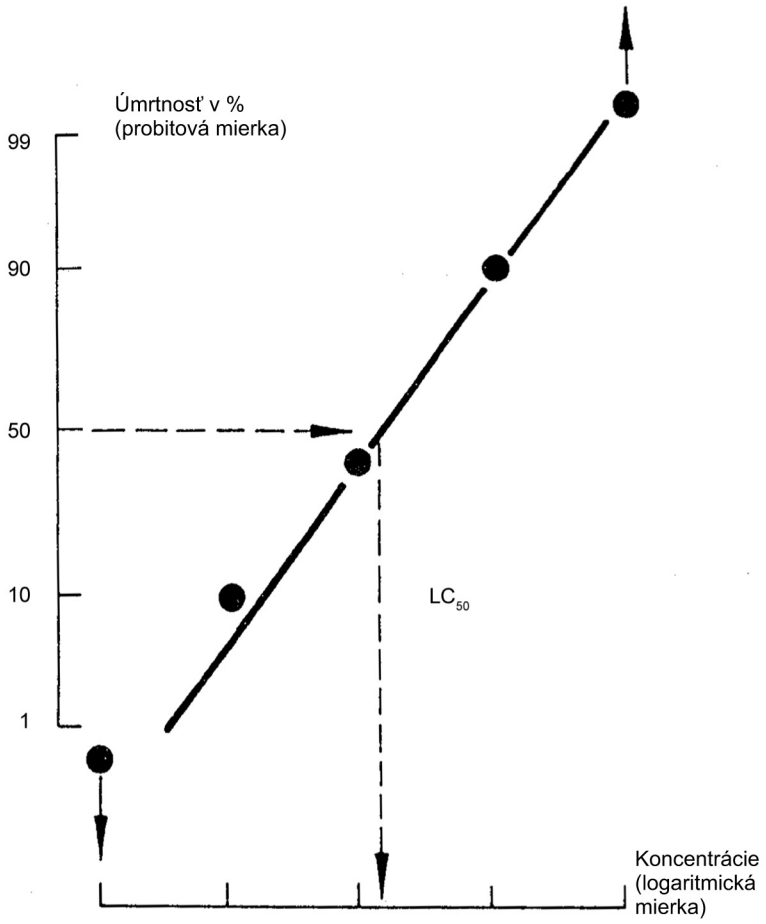
Ryby uvedené v zozname vyššie sa dajú veľmi dobre chovať a sú dostupné počas celého roka. Dajú sa dobre rozmnožovať a chovať na rybárskych farmách alebo v laboratóriu, za kontrolovaných podmienok, čo sa týka ochorení a parazitov, takže testované zvieratá sú zdravé a známeho rodičovského pôvodu. Tieto ryby sú dostupné v mnohých častiach sveta.

▼B

Dodatok 3

Príklad krivky závislosti mortality, vyjadrenej v percentách, od koncentrácie

Príklad stanovenia LC_{50} na pravdepodobnostnom logaritmickom papieri



▼B

C.2. **TEST AKÚTNEJ IMOBILIZÁCIE DAFNIÍ *(DAPHNIA* SP.)**

1. **METÓDA**

Táto metóda testu akútnej imobilizácie je ekvivalentná OECD TG 202 (2004).

1.1. ÚVOD

Táto metóda opisuje test akútnej toxicity na posúdenie účinkov chemikálií na dafnie. Existujúce testovacie metódy sa použili v najväčšom možnom rozsahu – pozri (1, 2, 3).

1.2. VYMEDZENIE POJMOV

V kontexte tejto metódy sa používajú tieto definície:

EC_{50}: je koncentrácia odhadnutá na imobilizovanie 50 % dafnií počas stanovenej expozičnej doby; ak sa použije iná definícia, musí sa to zaznamenať spolu s príslušným odkazom.

Imobilizácia: Tie živočíchy, ktoré nedokážu plávať do 15 sekúnd po jemnom premiešaní testovacej nádoby, sa pokladajú za imobilizované (a to aj keď ešte stále dokážu pohybovať svojimi tykadlami).

1.3. PODSTATA TESTOVACEJ METÓDY

Mladé dafnie, ktoré sú na začiatku testu mladšie ako 24 hodín, sú počas 48 hodín exponované testovanej chemickej látke v rôznych koncentráciách. Imobilizácia sa zaznamenáva po 24 hodinách a 48 hodinách sa porovnáva s kontrolnými hodnotami. Výsledky sa analyzujú, aby sa vypočítali hodnoty EC_{50} po 48 h (pozri definície uvedené v oddiele 1.2). Stanovenie hodnoty EC_{50} po 24 hodinách je voliteľné.

1.4. ÚDAJE O TESTOVANEJ CHEMICKEJ LÁTKE

Pre testovanú látku by mala byť známa rozpustnosť vo vode a tlak pary a ďalej by mala byť dostupná spoľahlivá analytická metóda na stanovenie koncentrácie danej látky v testovacom roztoku udanou účinnosťou výťažnosti a mala by byť dostupná medza stanovenia. Medzi užitočné informácie patrí štruktúrny vzorec, čistota látky, stabilita vo vode alebo na svetle, P_{ow} a výsledky testu biodegradácie (pozri metódu C.4).

Poznámka: Usmernenie na testovanie látok, ktorých testovanie je v dôsledku ich fyzikálno-chemických vlastností ťažko uskutočniteľné, sú uvedené v odkazoch na literatúru (4).

1.5. REFERENČNÉ CHEMICKÉ LÁTKY

Ako prostriedok na zaistenie spoľahlivých testovacích podmienok možno referenčnú látku testovať so zreteľom na hodnotu EC_{50}. Na tento účel sa odporúča použiť toxické látky používané pri medzinárodných kruhových testoch – pozri odkazy na literatúru (1, 5) ([1]). Test (testy) s referenčnou chemickou látkou by sa mali vykonávať prednostne každý mesiac a najmenej dvakrát ročne.

([1]) Vo výsledkoch týchto medzilaboratórnych testov a technických korigendách k norme ISO 6341 sa udáva hodnota EC_{50} po 24 hodinách pre dvojchróman draselný ($K_2Cr_2O_7$) v rozsahu od 0,6 mg/l do 1,7 mg/l.

▼B

1.6. KVALITATÍVNE KRITÉRIÁ

Platnosť testu je podmienená splnením týchto kritérií:

— v kontrolných vzorkách, vrátane kontrolnej vzorky obsahujúcej solubilizačné činidlo, by nemalo byť imobilizovaných viac ako 10 % dafnií,

— koncentrácia rozpusteného kyslíka na konci testu by mala zodpovedať hodnote > 3 mg/l v kontrolných a testovacích nádobách.

Poznámka: Pri prvom kritériu by viac ako 10 % kontrolných dafnií nemalo vykazovať imobilizáciu ani iné príznaky ochorenia alebo stresu, napríklad zmenu sfarbenia, nezvyčajné správanie, ako je napríklad uviaznutie na hladine vody.

1.7. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.7.1. **Aparatúra**

Testovacie nádoby a iná aparatúra, ktoré prídu do styku s testovacími roztokmi, by mali byť vyrobené výlučne zo skla alebo iného chemicky inertného materiálu. Testovacími nádobami sú bežne sklené skúmavky alebo kadičky; pred každým použitím by sa mali vyčistiť štandardnými laboratórnymi postupmi. Testovacie nádoby by sa mali voľne prekryť, aby sa znížili straty vody v dôsledku odparovania a aby sa predišlo vnikaniu prachu do roztokov. Prchavé látky by sa mali testovať v úplne zaplnených a uzavretých nádobách dostatočne veľkých, aby sa zabránilo limitným alebo príliš nízkym koncentráciám kyslíka (pozri oddiel 1.6 a prvý odsek oddielu 1.8.3).

Okrem toho sa budú používať niektoré alebo všetky tieto zariadenia: oxymeter (s mikroelektródou alebo iným vhodným snímačom na meranie rozpusteného kyslíka vo vzorkách s malým objemom); pH-meter; zodpovedajúca aparatúra na kontrolu teploty; vybavenie na stanovenie celkovej koncentrácie organického uhlíka (TOC); vybavenie na stanovenie chemickej spotreby kyslíka (COD); vybavenie na stanovenie tvrdosti atď.

1.7.2. **Testovacie organizmy**

Preferovaným testovacím druhom *Daphnia magna* Straus, aj keď pri tomto teste možno takisto použiť ďalšie vhodné druhy dafnií (napríklad *Daphnia pulex)*. Na začiatku testu by živočíchy mali byť mladšie ako 24 hodín a na zníženie variability sa dôrazne odporúča, aby neboli z prvej generácie potomkov. Mali by pochádzať zo zdravého rodu (t. j. bez príznakov stresu, ako napríklad vysoká mortalita, prítomnosť samcov a efipií, oneskorené liahnutie prvých potomkov, zmena sfarbenia organizmov atď.). Všetky organizmy použité v konkrétnom teste by mali pochádzať z kultúr vypestovaných z rovnakého rodu dafnií. Tento rod živočíchov sa musí uchovávať v kultivačných podmienkach (svetlo, teplota, médium), ktoré sa podobajú podmienkam v použitom teste. Ak sa má v teste použiť kultivačné médium odlišné od rutinného kultivačného média dafnií, je správnou praxou zaradiť predtestové aklimatizačné obdobie. Na tento účel by sa generácia dafnií mala uchovávať v riediacej vode pri testovacej teplote aspoň počas 48 hodín pred začiatkom testu.

▼B

1.7.3. **Zadržiavacia a riediaca voda**

Prírodná voda (povrchová alebo podzemná voda), rekonštituovaná voda alebo odchlórovaná voda z vodovodu sú prijateľné ako zadržiavacia a riediaca voda, ak v nej dafnie prežijú počas celej kultivácie, aklimatizácie a testovania bez príznakov stresu. Každá voda, ktorá vyhovuje chemickým charakteristikám prijateľnej riediacej vody podľa zoznamu uvedeného v dodatku 1, je vhodná ako testovacia voda. Počas trvania testu by si voda mala mať stálu kvalitu. Rekonštituovanú vodu možno vyrobiť pridaním špecifického množstva reagentov uznanej analytickej čistoty do deionizovanej alebo destilovanej vody. Príklady rekonštituovanej vody sú uvedené v odkazoch na literatúru (1), (6) a v dodatku 2. Je dôležité poznamenať, že médiá obsahujúce známe chelačné činidlá, ako sú médiá M4 a M7 v dodatku 2, by sa nemali používať na testovanie látok obsahujúcich kovy. Hodnota pH by mala byť v rozsahu od 6 do 9. Pre *Daphnia magna* sa odporúča tvrdosť vody v rozsahu od 140 do 250 mg/l (ako $CaCO_3$), pričom pre ostatné druhy dafnií môže byť vhodná aj nižšia tvrdosť vody. Riediaca voda sa pred použitím v teste môže prevzdušňovať, aby sa dosiahla nasýtená koncentrácia rozpusteného kyslíka.

Ak sa používa prírodná voda, parametre kvality by sa mali merať aspoň dvakrát ročne, alebo vždy, keď vznikne podozrenie, že sa tieto parametre mohli výrazne zmeniť (pozri predchádzajúci odsek a prílohu 1). Mal by sa stanoviť aj obsah ťažkých kovov (napríklad Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni). Ak sa používa odchlórovaná voda z vodovodu, odporúča sa každodenná analýza obsahu chlóru. Ak riediaca voda pochádza z povrchového alebo podzemného zdroja vody, mali by sa stanoviť jej vodivosť a celkový organický uhlík (TOC) alebo chemického kyslíka (COD).

1.7.4. **Testovacie roztoky**

Testovacie roztoky so zvolenými koncentráciami sa zvyčajne pripravujú riedením základného roztoku. Zásobné roztoky by sa prednostne mali pripravovať rozpustením testovanej látky v riediacej vode. V najvyššej možnej miere by sa malo zabrániť použitiu rozpúšťadiel, emulgátorov alebo dispergačných činidiel. Tieto činidlá však môžu byť v niektorých prípadoch potrebné na vytvorenie vhodne koncentrovaného zásobného roztoku. Usmernenie k výberu vhodných rozpúšťadiel, emulgačných a dispergačných činidiel je uvedené v odkaze na literatúru (4). Testovaná látka by rozhodne nemala v testovacích roztokoch presiahnuť hranicu rozpustnosti v riediacej vode.

Test by sa mal vykonať bez úpravy pH. Ak pH nezostane v rozmedzí 6 – 9, potom by sa mohol vykonať druhý test, pri ktorom sa upraví pH základného roztoku na hodnotu, ktorú vykazuje riediaca voda pred pridaním testovanej látky. Úprava hodnoty pH by sa mala vykonať tak, aby sa významne nezmenila koncentrácia zásobného roztoku a aby nedošlo k chemickej reakcii alebo zrážaniu testovanej látky. Prednosť sa dáva použitiu HCl a NaOH.

▼B

1.8. POSTUP

1.8.2. **Podmienky expozície**

1.8.1.1. *Testované skupiny a kontrolné vzorky*

Testovacie nádoby sa naplnia príslušným objemom riediacej vody a roztoku testovanej látky. Pomer objemov vzduchu a vody v nádobe by mal byť rovnaký pre testovanú i kontrolnú skupinu. Potom sa do testovacích nádob vložia dafnie. Pre každú testovaciu koncentráciu a pre každú kontrolnú vzorku by sa malo použiť najmenej 20 organizmov, rozdelených prednostne do štyroch skupín po piatich organizmoch. Na každý organizmus by sa malo použiť aspoň 2 ml testovacieho roztoku (to znamená 10 ml pre 5 dafnií v každej testovacej nádobe). Ak nebude koncentrácia testovanej látky stála, test sa môže vykonať s použitím polostatickej obnovy alebo prietokového systému.

Okrem testovacej série sa musí vykonať jedna séria kontrol s riediacou vodou, a ak je to relevantné, tak aj kontrolná séria obsahujúca solubilizačné činidlo.

1.8.1.2. *Testovacie koncentrácie*

Ak nie sú dostupné informácie o toxicite testovanej látky, možno rozsah koncentrácií konečného testu stanoviť testom na stanovenie rozsahu. Na tento účel sa dafnie exponujú sérii široko odstupňovaných koncentrácií testovanej látky. Každej testovacej koncentrácii by sa malo exponovať päť dafnií počas 48 hodín alebo počas kratšieho času a opakovanie testu nie potrebné. Expozičnú dobu možno skrátiť (napríklad na 24 hodín alebo menej), ak za kratší čas možné získať údaje pre test na zistenie rozsahu.

Malo by sa použiť najmenej päť testovacích koncentrácií. Tieto koncentrácie by mali tvoriť geometrický rad s rozdeľovacím koeficientom, ktorý by nemal presiahnuť 2,2. Použitie menej ako 5 koncentrácií by sa malo zdôvodniť. Podľa možnosti by najvyššia testovaná koncentrácia mala vyvolať 100 % imobilizáciu a najnižšia testovaná koncentrácii by nemala mať pozorovateľné účinky.

1.8.2.3. *Inkubačné podmienky*

Teplota by sa mala byť v rozsahu od 18 °C do 22 °C a pri každom jednotlivom teste by teplota ma byť stála v rozpätí ± 1 °C. Odporúča sa cyklus so 16 hodinami svetla a 8 hodinami tmy. Úplná tma je takisto prijateľná, najmä pre testované látky nestabilné na svetle.

Testovacie nádoby sa počas testu nesmú prevzdušňovať. Test sa vykonáva bez úpravy hodnoty pH. Dafnie by sa počas testu nemali kŕmiť.

1.8.1.4. *Dĺžka trvania testu*

Dĺžka trvania testu je 48 hodín.

1.8.2. **Pozorovania**

V každej testovacej nádobe by sa mal skontrolovať počet imobilizovaných dafnií po 24 a 48 hodinách od začiatku testu (pozri definície v oddiele 1.2). Okrem imobility by sa malo zaznamenať aj nezvyčajné správanie alebo vzhľad.

▼B

1.8.3. **Analytické merania**

Koncentrácie rozpusteného kyslíka a pH sa merajú na začiatku a na konci testu v kontrolných vzorkách a pri najvyššej koncentrácii testovanej látky. Koncentrácia rozpusteného kyslíka v kontrolných testoch by mala zodpovedať kritériu validity (pozri oddiel 1.6). Za bežných okolností by sa hodnota pH pri žiadnom teste nemala zmeniť o viac ako o 1,5 jednotky. Teplota sa zvyčajne meria v kontrolných nádobách alebo v okolitom vzduchu a mala by sa zaznamenávať prednostne nepretržite počas testu alebo aspoň na jeho začiatku a na konci.

Koncentrácia testovanej látky by sa mala zmerať aspoň pri najvyššej a najnižšej testovacej koncentrácii a na začiatku a na konci testu (4). Odporúča sa, aby výsledky boli založené na zmeraných koncentráciách. Ak je však k dispozícii dôkaz preukazujúci, že počas celého testu bola koncentrácia testovanej látky uspokojivo udržiavaná v rozmedzí ± 20 % menovitej alebo počiatočnej nameranej koncentrácie, je možné výsledky založiť na menovitých alebo nameraných počiatočných hodnotách.

1.9. LIMITNÝ TEST

Pomocou postupov opísaných v tejto metóde možno vykonať limitný test so 100 mg/l testovanej látky alebo do výšky jej rozpustnosti v testovacom médiu (podľa toho, ktorá hodnota je nižšia) s cieľom preukázať, že hodnota EC_{50} je vyššia ako táto koncentrácia. Limitný test treba vykonať s použitím 20 dafnií (podľa možnosti rozdelených do štyroch skupín po piatich dafniách), pričom rovnaký počet organizmov je aj v kontrolných testoch. Ak dôjde k imobilizácii, mala by sa vykonať úplná štúdia. Akékoľvek nenormálne správanie organizmov by sa malo zaznamenať.

2. **ÚDAJE**

Údaje by sa mali zhrnúť v tabuľkovej podobe, pričom pri každej exponovanej skupine a kontrolnom teste je potrebné uviesť počet použitých dafnií a imobilizáciu pri každom pozorovaní. Percentuálny podiel imobilizovaných organizmov za 24 hodín a 48 hodín sa vynesie vzhľadom na testované koncentrácie. Údaje sa analyzujú pomocou vhodných štatistických metód (napríklad probitová analýza atď.) s cieľom vypočítať sklon kriviek a hodnôt EC_{50} s 95 % intervalmi spoľahlivosti ($p = 0,05$) (7), (8).

Ak nemožno zo získaných údajov vypočítať EC_{50} štandardnými metódami, mala by byť hodnota EC_{50} aproximovaná ako geometrická stredná hodnota z najvyššej koncentrácie nespôsobujúca imobilizáciu a najnižšej koncentrácie spôsobujúcej 100 % imobilitu.

3. **VYKAZOVANIE**

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o vykonaní testu musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

— fyzikálna podstata a príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti,

▼B

— identifikačné chemické údaje vrátane čistoty.

Testovací živočíšny druh:

— zdroj a živočíšny druh *Daphnia,* dodávateľ zdroja (ak je známy) a použité kultivačné podmienky (vrátane zdroja, druhu a množstva potravy, frekvencie kŕmenia).

Testovacie podmienky:

— opis testovacích nádob: typ nádob, objem roztoku, počet dafnií v každej testovacej nádobe, počet testovacích nádob (replikáty) na jednu koncentráciu,

— metódy prípravy zásobných a testovacích roztokov vrátane použitia akýchkoľvek rozpúšťadiel alebo dispergačných činidiel, použité koncentrácie,

— podrobnosti o riediacej vode: zdroj a kvalitatívne charakteristiky vody (pH, tvrdosť, pomer Ca/Mg, pomer Na/K, zásaditosť, vodivosť atď.); zloženie rekonštituovanej vody, ak sa použila,

— inkubačné podmienky: teplota, intenzita svetla a jeho periodicita, rozpustený kyslík, pH atď.

Výsledky:

— počet a percentuálny podiel dafnií, ktoré boli imobilizované alebo u ktorých sa prejavili nejaké nežiaduce účinky (vrátane nenormálneho správania) v kontrolných vzorkách a v každej exponovanej skupine v jednotlivých časoch pozorovania, a opis povahy pozorovaných účinkov,

— výsledky a dátum vykonania testu s referenčnou látkou, ak sú dostupné,

— menovité testovacie koncentrácie a výsledky všetkých analýz na stanovenie koncentrácie testovanej látky v testovacích nádobách; takisto by sa mala uviesť výťažnosť metódy a medzu stanovenia,

— všetky fyzikálno-chemické merania teploty, pH a rozpusteného kyslíka vykonávané počas testu,

— hodnota EC_{50} po 48 hodinách pre imobilizáciu spolu s uvedením intervalov spoľahlivosti a grafmi upraveného modelu použitého na výpočet tejto hodnoty, sklony kriviek závislosti odozvy od dávky a ich smerodajná chyba; štatistické postupy použité na stanovenie hodnoty EC_{50}; (ak sa tieto parametre merali aj pre imobilizáciu po 24 hod., mali by sa taktiež uviesť),

— vysvetlenie akejkoľvek odchýlky od testovacej metódy a toho, či táto odchýlka ovplyvnila výsledky testu.

4. ODKAZY NA LITERATÚRU

(1) ISO 6341. (1996). Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. Third edition, 1996.

(2) EPA OPPTS 850.1010. (1996). Ecological Effects Test Guidelines – Aquatic Invertebrate Acute Toxicity Test, Freshwater Daphnids.

▼B

(3) Environment Canada. (1996) Biological test method. Acute Lethality Test Using *Daphnia* spp. EPS 1/RM/11. Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.

(4) Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publication. Series on Testing and Assessment. No. 23. Paris 2000.

(5) Commission of the European Communities. Study D8369. (1979). Inter-laboratory Test Programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to *Daphnia.*

(6) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Guideline 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, adopted September 1998.

(7) Stephan C.E. (1977). Methods for calculating an LC_{50}. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and JL. Hamelink). ASTM STP 634 – American Society for Testing and Materials. Pp 65 – 84

(8) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in Biological Assay. 3rd ed. London. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

DODATOK 1

NIEKTORÉ CHEMICKÉ CHARAKTERISTIKY PRIJATEĽNEJ RIEDIACEJ VODY

Látka	Koncentrácia
Tuhé častice	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Neionizovaný čpavok	< 1 µg/l
Reziduálny chlór	< 10 µg/l
Celkové organofosfátove pesticídy	< 50 ng/l
Celkové organofosfátove pesticídy a polychlórované bifenyly	< 50 ng/1
Celkový organický chlór	< 25 ng/1

▼B

DODATOK 2

PRÍKLADY VHODNEJ REKONŠTITUOVANEJ TESTOVACEJ VODY

Testovacia voda ISO (1)

Zásobné roztoky (jedna látka)		Na prípravu rekonštituovanej vody pridajte toto množstvo základného roztoku do 1 litra vody (*)
Látka	Množstvo pridané do 1 litra vody (*)	
Chlorid vápenatý $CaCl_2$, $2H_2O$	11,76 g	25 ml
Síran horečnatý $MgSO_4$, $7H_2O$	4,93 g	25 ml
Uhličitan sodný $NaHCO_3$	2,59 g	25 ml
Chlorid draselný KC1	0,23 g	25 ml

(*) Voda s primeranou čistotou, napr. deionizovaná, destilovaná, prípadne voda získaná reverznou osmózou s vodivosťou, ktorá by nemala presahovať 10 $\mu S.cm^{-1}$.

Elendtovo médium M7 a M4

Aklimatizácia na Elendtovo médium M4 a M7

V niektorých laboratóriách mali ťažkosti pri priamom prenose dafnií do médií M4 a M7. Na druhej strane sa však dosiahol určitý úspech s postupnou aklimatizáciou, t. j. prenosom z vlastného média do 30 % Elendtovho média, potom do 60 % Elendtovho média a následne do 100 % Elendtovho média. Potrebná dĺžka aklimatizačného obdobia môže byť až jeden mesiac.

Príprava

Stopové prvky

Vo vode vykazujúcej vhodnú čistotu, napríklad v deionizovanej, destilovanej, prípadne vo vode získanej reverznou osmózou, sa najprv pripravia samostatné zásobné roztoky (I) jednotlivých stopových prvkov. Z týchto oddelených zásobných roztokov (I) sa pripraví jeden zásobný roztok (II), ktorý obsahuje všetky stopové prvky (kombinovaný roztok), t. j.:

Zásobný(-é) roztok(-y) I (jedna látka)	Množstvo pridané do vody (mg/l)	Koncentrácia (vzhľadom na médium M4)	Na prípravu kombinovaného zásobného roztoku II pridajte do vody toto množstvo základného roztoku I (ml/l)	
			M4	M7
H_3 BO_3	57 190	20 000-násobná	1,0	0,25
$MnCl_2$ $4H_2O$	7 210	20 000-násobná	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000-násobná	1,0	0,25

▼B

Zásobný(-é) roztok(-y) I (jedna látka)	Množstvo pridané do vody (mg/l)	Koncentrácia (vzhľadom na médium M4)	Na prípravu kombinovaného zásobného roztoku II pridajte do vody toto množstvo základného roztoku I (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000-násobná	1,0	0,25
$SrCl_2$ $6H_2O$	3 040	20 000-násobná	1,0	0,25
NaBr	320	20 000-násobná	1,0	0,25
Na_2 MoO_4 $2H_2O$	1 230	20 000-násobná	1,0	0,25
$CuCl_2$ $2H_2O$	335	20 000-násobná	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000-násobná	1,0	1,0
$CoCl_2$ $6H_2O$	200	20 000-násobná	1,0	1,0
KI	65	20 000-násobná	1,0	1,0
Na_2 SeO_3	43,8	20 000-násobná	1,0	1,0
NH_4 VO_3	11,5	20 000-násobná	1,0	1,0
Na_2 EDTA $2H_2O$	5 000	20 000-násobná	—	—
$FeSO_4$ $7H_2O$	1 991	20 000-násobná	—	—

Ako roztok Na 2 EDTA, tak roztok $FeSO_4$ sa pripraví samostatne, zlejú sa spolu a ihneď sa ošetria v autokláve.

Týmto sa získa:

2 l Fe-EDTA roztoku		1 000-násobná	20,0	5,0

Médiá M4 aM7

Médiá M4 a M7 sa pripravia pomocou zásobného roztoku II, makroživín a vitamínov takto:

	Množstvo pridané do vody (mg/l)	Koncentrácia (vzhľadom na médium M4)	Množstvo zásobného roztoku II pridané na prípravu média II (ml/l)	
			M4	M7
Zásobný roztok II (kombinované stopové prvky)		20-násobná	50	50
Zásobné roztoky s obsahom makroživiny (jedna látka)				
$CaCl_2 \cdot 2H_20$	293 800	1 000-násobná	1,0	1,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246 600	2 000-násobná	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000-násobná	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000-násobná	1,0	1,0
Na_2 $SiO_3 \cdot 9H_2O$	50 000	5 000-násobná	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000-násobná	0,1	0,1
KH_2 PO_4	1 430	10 000-násobná	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000-násobná	0,1	0,1

▼B

	Množstvo pridané do vody (mg/l)	Koncentrácia (vzhľadom na médium M4)	Množstvo zásobného roztoku II pridané na prípravu média II (ml/l)	
			M4	M7
Zásobný roztok s obsahom viacerých vitamínov	—	10 000-násobná	0,1	0,1
Zásobný roztok s obsahom viacerých vitamínov sa pripraví pridaním 3 vitamínov do 1 litra vody týmto spôsobom:				
Thiamín hydrochlorid	750	10 000-násobná		
Kyanokobalamín (B_{12})	10	10 000-násobná		
Biotín	7,5	10 000		

Kombinovaný vitamínový zásobný roztok sa skladuje zmrazený v malých alikvótnych častiach. Vitamíny sa pridávajú do média tesne pred použitím.

Poznámka: Precipitácii solí počas prípravy kompletného média sa zabráni pridaním alikvotných množstiev zásobných roztokov do približne 500 – 800 ml deionizovanej vody a potom sa objem doplní na 1 liter.

Poznámka: Prvýkrát boli informácie o médiu M4 uverejnené v práci Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructual approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, 25 – 33.

▼M1

C.3. SLADKOVODNÉ RIASY A SINICE, TEST INHIBÍCIE RASTU

1. METÓDA

Táto metóda je rovnocenná s OECD TG 201 (2006) (1).

1.1. ÚVOD

Testovacie metódy sa pravidelne revidujú a aktualizujú vzhľadom na vedecký pokrok. Bolo potrebné revidovať testovaciu metódu C.3 tak, aby zahŕňala ďalšie druhy a spĺňala požiadavky posudzovania rizika a aby bola uvedená klasifikácia chemických látok. Revízia sa uskutočnila na základe rozsiahlych praktických skúseností, vedeckého pokroku v oblasti štúdií toxicity rias a rozsiahleho regulačného využitia, ktoré od pôvodného prijatia metódy nastali.

1.2. VYMEDZENIE POJMOV

Na účely tejto testovacej metódy sa používajú tieto pojmy a skratky:

Biomasa: je suchá hmotnosť živej hmoty nachádzajúcej sa v populácii, vyjadrená ako daný objem, napr. mg rias/liter testovaného roztoku. „Biomasa“ je obvykle definovaná ako hmotnosť, ale v tomto teste sa toto slovo používa na vyjadrenie hmotnosti na objem. V tomto teste biomasu vyjadruje napr. aj počet buniek, fluorescencia atď., ktoré sa bežne merajú, a teda používanie pojmu „biomasa“ sa vzťahuje aj na tieto náhradné kritériá.

Koeficient odchýlky: je bezrozmerná hodnota premenlivosti parametra definovaná ako pomer štandardnej odchýlky k strednej hodnote. Môže sa vyjadriť aj ako percentuálna hodnota. Stredný koeficient odchýlky priemernej špecifickej rýchlosti rastu sa v paralelných kontrolných kultúrach vypočíta takto:

1. Vypočítajte % KO priemerného špecifického rastu na základe každodenných rýchlostí rastu/rýchlostí rastu po častiach pre príslušné paralelky.

2. Vypočítajte strednú hodnotu zo všetkých hodnôt vypočítaných v bode 1 na získanie stredného koeficientu zmeny špecifickej dennej rýchlosti rastu/špecifickej rýchlosti rastu po častiach v paralelných kontrolných kultúrach.

EC_x: je koncentrácia testovanej látky rozpustená v testovacom médiu, ktorej následkom je x % (napr. 50 %) zníženie rastu testovaného organizmu v rámci stanoveného času expozície (je potrebné výslovne uviesť, ak sa odchyľuje od celkovej alebo obvyklej dĺžky testu). Na jednoznačné zaznamenanie hodnoty EC odvodenej od rýchlosti rastu sa používa symbol „E_rC“ alebo symbol „E_yC“ na zaznamenanie hodnoty z výťažku.

Rastové médium: je kompletné syntetické kultivačné médium, v ktorom testovaná riasa rastie v prítomnosti testovanej látky (expozícii, ktorej je vystavená). Testovaná látka sa za normálnych podmienok rozpustí v testovanom médiu.

Rýchlosť rastu (**priemerná špecifická rýchlosť rastu**): je logaritmickým nárastom biomasy počas času expozície testovanou látkou.

▼M1

Najnižšia koncentrácia s pozorovateľnými účinkami (LOEC): je najnižšia testovaná koncentrácia, pri ktorej sa pozoruje, že látka má štatisticky významný účinok na zníženie rastu (pri $p < 0,05$) v porovnaní s kontrolou v rámci daného času expozície. Škodlivý účinok všetkých testovaných koncentrácií nad LOEC sa však vždy rovná alebo je väčší ako účinky pozorované pri LOEC. Ak nie sú splnené tieto dve podmienky, je potrebné poskytnúť úplné vysvetlenie, akým spôsobom sa zvolila LOEC (a teda aj NOEC).

Koncentrácia bez pozorovaného účinku (NOEC): je testovaná koncentrácia bezprostredne pod LOEC.

Hodnota reakcie: je premenná hodnota na odhad toxicity odvodená z akýchkoľvek stanovených parametrov opisujúcich biomasu rôznymi metódami výpočtu. V prípade tejto metódy sú rýchlosti rastu a výťažok hodnotami reakcie odvodenými priamo z merania biomasy alebo uvedených náhradných parametrov.

Špecifická rýchlosť rastu: je hodnota premennej reakcie definovaná ako kvocient rozdielu prirodzených logaritmov parametra pozorovania (v tejto testovacej metóde biomasy) a príslušného časového intervalu.

Výťažok: je hodnota meranej premennej na konci času expozície mínus hodnota meranej premennej na začiatku času expozície na vyjadrenie nárastu biomasy počas testu.

1.3. POUŽITEĽNOSŤ TESTU

Táto testovacia metóda sa dá najľahšie použiť pre látky rozpustné vo vode, pri ktorých sa predpokladá, že za podmienok testu zostávajú vo vode. V prípade testovania látok, ktoré sú prchavé, silne sa adsorbujú, sú sfarbené, s nízkou rozpustnosťou vo vode, alebo látky, ktoré môžu ovplyvniť dostupnosť živín alebo minerálnych látok v testovacom médiu, môžu byť potrebné určité modifikácie uvedeného postupu (napr. uzatvorený systém, úprava testovacích nádob). Usmernenia k niektorým vhodným úpravám sú uvedené v (2) (3) a (4).

1.4. PRINCÍP TESTU

Cieľom tohto testu je stanoviť účinky látky na rast sladkovodných mikrorias a/alebo siníc. Exponenciálne rastúce testované organizmy sú vystavené testovanej látke v jednorazových kultúrach obvykle počas 72 hodín. Napriek pomerne krátkej dĺžke testu sa môžu hodnotiť účinky na niekoľkých generáciách.

Reakciou systému je zníženie rastu v sérii kultúr rias (testované jednotky) vystavených rôznym koncentráciám testovanej látky. Reakcia sa hodnotila ako funkcia expozičnej koncentrácie v porovnaní s priemerným rastom paralelných, nevystavených kontrolných kultúr. Na preukázanie úplnej reakcie systému na toxické účinky (optimálna citlivosť) sa kultúram umožní neobmedzený exponenciálny rast v podmienkach s vhodnými živinami a nepretržité svetlo počas času postačujúceho na meranie zníženia špecifickej rýchlosti rastu.

▼M1

Rast a inhibícia rastu sa kvantifikujú stanovením biomasy rias ako funkcie času. Biomasa rias je definovaná ako suchá hmotnosť na objem, napr. mg rias/liter testovaného roztoku. Suchá hmotnosť sa však zložito stanovuje, a preto sa používajú náhradné parametre. Z týchto náhradných parametrov sa najčastejšie používa počet buniek. Iné náhradné parametre zahŕňajú objem buniek, fluorescenciu, optickú hustotu atď. Je potrebné poznať prepočítavací koeficient medzi meraným náhradným parametrom a biomasou.

Konečným bodom testu je inhibícia rastu vyjadrená ako logaritmický nárast biomasy (priemerná špecifická rýchlosť rastu) počas času expozície. Z priemerných špecifických rýchlostí rastu zaznamenaných v sérii testovaných roztokov sa stanoví koncentrácia, ktorá spôsobuje špecifickú x % inhibíciu rýchlosti rastu (napr. 50 %), a vyjadrí sa ako E_rC_x (napr. E_rC_{50}).

Na uplatnenie tejto metódy v regulačnom rámci EÚ by sa mal výpočet výsledkov opierať o priemernú špecifickú rýchlosť rastu z dôvodov uvedených v odseku 2.2. Ďalšou hodnotou reakcie použitou v tejto testovacej metóde je výťažok, ktorý sa v niektorých krajinách vyžaduje na splnenie špecifických regulačných požiadaviek. Definovaný je ako biomasa na konci času expozície mínus biomasa na začiatku času expozície. Z výťažkov zaznamenaných v sérii testovaných roztokov sa stanoví koncentrácia, ktorá spôsobuje špecifickú x % inhibíciu výťažku (napr. 50 %), a vypočíta sa a vyjadrí ako E_yC_x (napr. E_yC_{50}).

Okrem toho možno štatisticky stanoviť najnižšiu koncentráciu s pozorovateľnými účinkami (LOEC) a koncentráciu bez pozorovaného účinku (NOEC).

1.5. INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

Informácie o testovanej látke, ktoré môžu byť užitočné pri stanovovaní testovacích podmienok, zahŕňajú štrukturálny vzorec, čistotu, svetelnú stálosť, stabilitu pri skúšobných podmienkach, vlastnosti týkajúce sa absorpcie svetla, pKa a výsledky štúdií transformácie vrátane biologickej odbúrateľnosti vo vode.

Rozpustnosť vo vode, rozdeľovací koeficient oktanol-voda (P_{ow}) a tlak pary testovanej látky musia byť známe a musí byť k dispozícii validovaná metóda na kvantifikáciu látky v testovaných roztokoch so zaznamenanou výťažnosťou a detekčný limit.

1.6. REFERENČNÁ LÁTKA

Referenčná(-é) látka(-y), ako napr. 3,5-dichlórfenol, používané v medzinárodnej kruhovej skúške (4) sa môže(-u) testovať ako prostriedok kontroly postupu testu. Pre zelené riasy sa môže použiť ako referenčná látka aj dvojchroman draselný. Referenčnú látku je potrebné testovať aspoň dvakrát do roka.

1.7. PLATNOSŤ TESTU

Test je platný, ak sú splnené tieto kritériá:

▼**M1**

— Biomasa v kontrolných kultúrach sa musí exponenciálne zvýšiť aspoň o faktor 16 počas 72-hodinového času testu. To je v súlade so špecifickou rýchlosťou rastu 0,92 deň$^{-1}$. Rýchlosť rastu je obvykle podstatne vyššia pre najčastejšie používané druhy (pozri dodatok 1). Toto kritérium sa nemusí splniť, ak sa používajú druhy, ktoré rastú pomalšie ako druhy, ktoré sú uvedené v dodatku 1. V tomto prípade sa čas testu predĺži, aby sa dosiahol aspoň 16-násobný rast v kontrolných kultúrach, pričom počas trvania testu musí byť rast exponenciálny. Trvanie testu sa môže skrátiť najmenej na 48 hod., aby sa zachoval neobmedzený exponenciálny rast počas testu, pokiaľ sa dosiahol minimálny multiplikačný faktor 16.

— Priemerný koeficient odchýlky pre špecifické rýchlosti rastu po častiach (dni 0 – 1, 1 – 2 a 2 – 3 pre 72-hodinové testy) v kontrolných kultúrach (pozri oddiel 1.2 pod nápisom „koeficient odchýlky“) nesmie byť väčší ako 35 %. Pozri druhý odsek v oddiele 2.2.1 na výpočet špecifických rýchlostí rastu po častiach. Toto kritérium platí na strednú hodnotu koeficientov odchýlky vypočítanú pre paralelné kontrolné kultúry.

— Koeficient odchýlky priemerných špecifických rýchlostí rastu počas celého času testu v paralelných kontrolných kultúrach nesmie byť väčší ako 7 % v testoch s *Pseudokirchneriella subcapitata* a *Desmodesmus subspicatus*. Pre iné, menej často testované druhy nesmie hodnota presiahnuť 10 %.

1.8. OPIS METÓDY

1.8.1. **Prístroje**

Testovacie nádoby a iné prístroje, ktoré prichádzajú do styku s testovanými roztokmi, musia byť celé zo skla alebo iného chemicky inertného materiálu. Predmety sa musia dôkladne umyť, aby sa zabezpečilo, že žiadne organické ani anorganické kontaminanty neovplyvnia rast rias ani zloženie testovaných roztokov.

Testovacími nádobami sú zvyčajne sklené banky s rozmermi, ktoré umožnia dostačujúci objem kultúry pre merania počas testu a prenos dostatočného množstva CO_2 z atmosféry (pozri druhý odsek v oddiele 1.8.9). Pamätajte, že objem kvapaliny musí byť postačujúci pre analytické stanovenia (pozri piaty odsek v oddiele 1.8.11).

Okrem toho budú potrebné niektoré z týchto zariadení:

— prístroj na kultiváciu: miestnosť alebo priestor, v ktorom sa môže udržiavať inkubačná teplota v rozmedzí ± 2 °C;

— prístroje na meranie svetla: je dôležité pripomenúť, že metóda merania intenzity svetla, a najmä typ receptora (kolektora) ovplyvní hodnotu merania. Merania by sa mali prednostne uskutočniť s použitím guľových (4 π) receptorov (ktoré reagujú na priame a odrazené svetlo zo všetkých uhlov nad a pod rovinou merania) alebo 2 π receptora (ktorý reaguje na svetlo zo všetkých uhlov nad rovinou merania);

▼M1

— prístroj na stanovenie biomasy rias. Počet buniek, ktorý je najčastejšie používaným náhradným parametrom za biomasu rias, sa môže vypočítať s použitím elektronického počítadla častíc, mikroskopu s počítacou komôrkou alebo prietokovým cytometrom. Iné náhradné parametre za biomasu možno zmerať s použitím prietokového cytometra, fluorimetra, spektrofotometra alebo kolorimetra. Na výpočet je potrebný prepočítavací faktor vzťahujúci sa na počet buniek na suchú hmotnosť. Na zabezpečenie potrebných meraní pri nízkych koncentráciách biomasy s použitím spektrofotometra môže byť potrebné použiť kyvety s dráhou svetla aspoň 4 cm.

1.8.2. **Testovacie organizmy**

Môžu sa použiť viaceré druhy voľne rastúcich mikrorias a siníc. Ukázalo sa, že kmene uvedené v dodatku 1 sú vhodné pre postup testu uvedený v tejto testovacej metóde.

V prípade použitia iných kmeňov je potrebné uviesť v správe o teste kmeň/alebo pôvod. Musí byť potvrdené, že sa môže zachovať exponenciálny rast zvolenej testovanej riasy počas času testu za obvyklých podmienok.

1.8.3. **Rastové médium**

Odporúčajú sa dve alternatívne rastové médiá, OECD a AAP médium. Zloženie týchto médií je uvedené v dodatku 2. Pamätajte, že počiatočná hodnota pH a kapacita tlmenia (regulujúca nárast pH) oboch médií je rozdielna. Z tohto dôvodu môžu byť výsledky testov odlišné v závislosti od použitého média, najmä ak sa testujú ionizujúce látky.

Na určité účely môže byť potrebné modifikovať rastové médium, napr. keď sa testujú kovy a chelatačné činidlá, alebo pri testovaní pri rôznych hodnotách pH. Použitie modifikovaného média sa musí podrobne opísať a odôvodniť (3) (4).

1.8.4. **Počiatočná koncentrácia biomasy**

Počiatočná biomasa v testovaných kultúrach musí byť rovnaká vo všetkých testovaných kultúrach a dostatočne nízka, aby umožnila exponenciálny rast počas inkubačného času bez rizika vyčerpania živín. Počiatočná biomasa by nemala byť vyššia ako 0,5 mg/l, vyjadrená ako sušina. Odporúčajú sa tieto počiatočné koncentrácie buniek:

Pseudokirchneriella subcapitata	$5 \times 10^3 – 10^4$	bunky/ml
Desmodesmus subspicatus	$2 – 5 \times 10^3$	bunky/ml
Navicula pelliculosa	10^4	bunky/ml
Anabaena flos-aquae	10^4	bunky/ml
Synechococcus leopoliensis	$5 \times 10^4 – 10^5$	bunky/ml

1.8.5. **Koncentrácie testovanej látky**

Rozsah koncentrácií, v ktorých sa môžu účinky prejaviť, sa môže stanoviť na základe výsledkov testov na zistenie rozsahu. Pre konečný definitívny test sa zvolí aspoň päť koncentrácií usporiadaných v geometrickom rade s faktorom maximálne 3,2. Pre testované látky vykazujúce plochú krivku reakcie na koncentráciu sa môže zvoliť vyšší faktor. Séria koncentrácií musí prednostne pokrývať rozmedzie 5 % – 75 % inhibície rýchlosti rastu rias.

▼M1

1.8.6. **Paralelky a kontroly**

Test sa uskutoční s tromi paralelkami pri každej testovanej koncentrácii. Ak sa nevyžaduje stanovenie NOEC, môže sa test pozmeniť a zvýšiť počet koncentrácií a znížiť počet paraleliek na koncentráciu. Musia byť aspoň 3 kontrolné paralelky a teoreticky by sa mal použiť dvojnásobný počet paraleliek pre každú testovanú koncentráciu.

Môže sa pripraviť oddelený súbor testovacích roztokov na analytické stanovenie testovanej látky (pozri štvrtý a šiesty odsek v oddiele 1.8.11).

Ak sa na rozpustenie testovanej látky používa rozpúšťadlo, musia sa v teste použiť ďalšie kontroly obsahujúce rozpúšťadlo v rovnakej koncentrácii, ako sa používa v testovaných kultúrach.

1.8.7. **Príprava inokula**

Na prispôsobenie testovaných rias testovacím podmienkam a zabezpečenie, aby sa riasy nachádzali v exponenciálnej fáze rastu, keď sa používajú na inokuláciu testovacích roztokov, sa pripraví inokulum v testovacom médiu 2 – 4 dni pred začiatkom testu. Biomasa rias sa musí upraviť, aby sa v inokule umožnil exponenciálny rast do začiatku testu. Inokulum sa inkubuje za rovnakých podmienok ako testované kultúry. V inokule sa meria nárast biomasy, aby sa zabezpečilo, že rast je v obvyklom rozsahu ako v prípade testovaného kmeňa za podmienok kultivácie. Príklad postupu na kultiváciu rias je opísaný v dodatku 3. Aby sa zabránilo súčasnému rozdeleniu buniek počas testu, môže byť potrebné uskutočniť druhý krok na rozmnoženie inokula.

1.8.8. **Príprava testovacích roztokov**

Všetky testovacie roztoky musia obsahovať rovnaké koncentrácie rastového média a počiatočnej biomasy testovanej riasy. Testovacie roztoky zvolených koncentrácií sa pripravujú obvykle zmiešaním zásobného roztoku testovanej látky s rastovým médiom a inokulom. Zásobné roztoky sa pripravujú obvykle rozpustením látky v testovacom médiu.

Rozpúšťadlá, napr. acetón, t-butyl alkohol a dimetylformamid, sa môžu použiť ako nosiče na pridávanie do testovacieho média látok s nízkou rozpustnosťou vo vode (2) (3). Koncentrácia rozpúšťadla nesmie byť vyššia ako 100 µl/l a rovnaká koncentrácia rozpúšťadla sa musí pridať do všetkých kultúr (vrátane kontrol) v testovanej sérii.

1.8.9. **Inkubácia**

Uzavrite testovacie nádoby zátkami prepúšťajúcimi vzduch. Nádoby sa pretrepú a umiestnia do kultivačného prístroja. Počas testu je potrebné ponechať riasy v suspenzii a umožniť prenos CO_2. Preto je potrebné neustále trepanie alebo miešanie. Kultúry sa musia uchovávať pri teplote v rozmedzí 21 °C až 24 °C s presnosťou ± 2 °C. Pre iné druhy, ako sú uvedené v dodatku 1, napr. pre tropické druhy, môžu byť vhodné vyššie teploty pod podmienkou, že budú splnené kritériá platnosti. Odporúča sa umiestniť banky náhodne a denne ich v inkubátore premiestňovať.

▼M1

Počas testu by sa pH kontrolného média nemalo zvýšiť o viac ako 1,5. Pre kovy a zlúčeniny, ktoré sa čiastočne ionizujú pri pH okolo testovacieho pH, môže byť potrebné limitovať kolísanie pH, aby sa získali reprodukovateľné a presné výsledky. Odchýlka < 0,5 pH je technicky možná a dá sa dosiahnuť zabezpečením prísunu dostatočného množstva CO_2 z okolitého vzduchu do testovacieho roztoku, napr. zvýšením rýchlosti trepania. Inou možnosťou je znížiť spotrebu CO_2 znížením počiatočnej biomasy alebo dĺžky testu.

Priestor, kde sa kultúry inkubujú, musí byť kontinuálne osvetlený rovnomerným fluorescenčným osvetlením, napr. studeným bielym svetlom alebo denným svetlom. Kmene rias a sinice sa odlišujú, pokiaľ ide o požiadavky na svetlo. Je potrebné zvoliť takú intenzitu, ktorá vyhovuje použitému testovanému organizmu. Pre odporúčané druhy zelených rias sa zvolí intenzita svetla na úrovni testovacích roztokov z rozsahu 60 – 120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ pri meraní vo fotosynteticky účinnom rozsahu vlnovej dĺžky 400 – 700 nm s použitím vhodného receptora. Niektoré druhy, najmä *Anabaena flos-aquae*, rastú dobre pri nižšej intenzite svetla a pri vyššej intenzite sa môžu poškodiť. Pre takéto druhy je potrebné zvoliť priemernú intenzitu svetla v rozmedzí 40 – 60 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$. (Pre prístroje na meranie svetla kalibrované v luxoch príslušné rozmedzie 4 440 – 8 880 luxov pre studené biele svetlo zodpovedá približne odporúčanej intenzite svetla 60 – 120 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$.) Počas inkubácie nesmie intenzita svetla kolísať viac ako ± 15 % priemernej intenzity svetla.

1.8.10. **Dĺžka testu**

Dĺžka testu je obvykle 72 hodín. Dĺžka testu sa však môže skrátiť alebo predĺžiť pod podmienkou, že budú splnené všetky kritériá platnosti v oddiele 1.7.

1.8.11. **Merania a analytické stanovenia**

Počas trvania testu sa v každej banke stanovuje množstvo biomasy minimálne jedenkrát za deň. Ak sa merania uskutočňujú s malými objemami odobratými z testovacieho roztoku pipetou, netreba ich nahradiť.

Meranie biomasy sa uskutočňuje manuálne počítaním buniek pomocou mikroskopu alebo elektronickým počítadlom častíc (ako počet buniek a/alebo biologický objem). Môžu sa použiť alternatívne techniky, napr. prietoková cytometria, *in vitro* alebo *in vivo* chlorofylová fluorescencia (6) (7), alebo optická hustota, a uspokojivú koreláciu s biomasou možno preukázať množstvom biomasy vyskytujúcim sa v teste.

pH roztokov sa meria na začiatku a na konci testu.

Ak je dostupný analytický postup na stanovenie testovanej látky v použitom rozsahu koncentrácie, musia sa testovacie roztoky analyzovať, aby sa skontrolovali počiatočné koncentrácie a či sa počas testu zachovávajú expozičné koncentrácie.

▼M1

Analýza koncentrácie testovanej látky na začiatku a na konci testu nízkej a vysokej testovanej koncentrácie a koncentrácie okolo predpokladaného EC_{50} môže byť dostačujúca, ak je pravdepodobnosť, že expozičné koncentrácie sa budú odlišovať o menej ako 20 % nominálnych hodnôt počas testu. Odporúča sa analýza všetkých testovaných koncentrácií na začiatku a na konci testu, ak nie je pravdepodobné, že koncentrácie budú v rozmedzí 80 % – 120 % nominálnych hodnôt. Pre prchavé, nestabilné alebo silne sa adsorbujúce testované látky sa odporúča ďalší odber vzoriek na analýzu v 24-hodinových intervaloch počas expozičného času, aby sa lepšie stanovil úbytok testovanej látky. Pre tieto látky budú potrebné ďalšie paralelky. Vo všetkých prípadoch je potrebné stanoviť koncentrácie testovanej látky iba v jednej paralelnej nádobe na každú testovanú koncentráciu (alebo na obsahy nádob rozdelené do paraleliek).

S testovacím médiom pripraveným osobitne na analýzu expozičných koncentrácií počas testu sa musí zaobchádzať rovnako ako s tými, ktoré sa používajú na testovanie, t. j. musia sa inokulovať riasami a inkubovať za rovnakých podmienok. Ak sa vyžaduje analýza rozpustenej testovanej látky, môže byť potrebné separovať riasy od média. Na separáciu sa prednostne použije centrifugácia pri nízkom g, dostatočnom na usadenie rias.

Ak je dokázané, že koncentrácia látky, ktorá sa má testovať, je v uspokojivej miere zachovaná v rozmedzí ± 20 % nominálnej hodnoty alebo nameranej počiatočnej koncentrácie počas testu, analýza výsledkov môže byť založená na nominálnych hodnotách alebo nameraných počiatočných hodnotách. Ak je odchýlka od nominálnej alebo nameranej počiatočnej koncentrácie väčšia ako ± 20 %, analýza výsledkov musí byť založená na geometrickej strednej koncentrácii počas expozície alebo na modeloch opisujúcich pokles koncentrácie testovanej látky (3) (8).

Inhibičný test rias je dynamickejším testovacím systémom ako väčšina iných krátkodobých testov toxicity pre vodné prostredie. V dôsledku toho môže byť zložité stanoviť skutočné expozičné koncentrácie, najmä pre adsorbujúce sa látky testované pri nízkych koncentráciách. V takýchto prípadoch úbytok látky z roztoku na základe adsorpcie s narastajúcim množstvom biomasy rias neznamená, že sa z testovacieho systému stratil. Pri analýze výsledku testu by sa malo skontrolovať, či zníženie koncentrácie testovanej látky v priebehu testu sprevádza zníženie inhibície rastu. Ak áno, môže sa zvážiť vhodný model, ktorý opisuje pokles koncentrácie testovanej látky (8). Ak nie, môže sa vyžadovať, aby bola analýza výsledkov založená na počiatočných (nominálnych alebo nameraných) koncentráciách.

1.8.12. **Iné pozorovania**

Musí sa uskutočniť mikroskopické pozorovanie na overenie normálneho a zdravého vzhľadu inokula a na zistenie akéhokoľvek neobvyklého vzhľadu rias (čo môže byť zapríčinené expozíciou testovanej látky) na konci testu.

▼M1

1.8.13. **Limitný test**

V určitých situáciách, napr. keď z predbežného testu vyplýva, že testovaná látka nemá žiadne toxické účinky pri koncentráciách do 100 $mg \cdot l^{-1}$ alebo do jej limitu rozpustnosti v testovacom médiu (podľa toho, ktorá hodnota je nižšia), sa môže uskutočniť limitný test umožňujúci porovnanie reakcií v kontrolnej skupine a jednej ošetrenej skupine (100 $mg \cdot l^{-1}$ alebo koncentrácia rovnaká ako limit rozpustnosti). Dôrazne sa odporúča, aby to bolo založené na analýze expozičnej koncentrácie. Na limitný test platia všetky už uvedené testovacie podmienky a kritériá platnosti s výnimkou, že musí byť aspoň šesť ošetrených paraleliek. Hodnoty reakcie v kontrolnej a ošetrenej skupine sa môžu analyzovať s použitím štatistického testu na porovnanie stredných hodnôt, napr. Študentov t-test. Ak variancie v oboch skupinách nie sú rovnaké, je potrebné uskutočniť t-test upravený na nerovnaké variancie.

1.8.14. **Modifikácia pre silno sfarbené látky**

Ožarovanie (intenzita svetla) by malo byť na najvyššom konci rozsahu predpísanom v tejto testovacej metóde: 120μE m-2 s-1 alebo vyššie.

Dráha svetla by sa mala skrátiť zmenšením obsahu testovacích roztokov (v rozpätí 5 – 25 ml).

Na dosiahnutie vysokej frekvencie vystavenia rias veľkému ožiareniu na povrchu kultúry je potrebné dostatočné pretrepanie (napríklad miernym zatrasením).

2. **ÚDAJE**

2.1. VYTVORENIE RASTOVÝCH KRIVIEK

Biomasa v testovacej nádobe môže byť vyjadrená v jednotkách náhradného parametra použitého na meranie (napr. počet buniek, svietivosť).

Na vytvorenie rastových kriviek usporiadajte do tabuľky stanovené koncentrácie biomasy v testovaných kultúrach a kontrolách spolu s koncentráciami testovaného materiálu a časmi merania zaznamenanými s rozlíšením aspoň na celé hodiny. V tomto prvom štádiu môžu byť užitočné obe stupnice, logaritmická aj lineárna, ale logaritmická stupnica je povinná a obvykle lepšie vyjadruje parametre charakterizujúce rast počas trvania testu. Pamätajte, že exponenciálny rast je vyjadrený priamkou, ak sa vytvorí na logaritmickej stupnici, a že sklon čiary (zošikmenie) označuje špecifickú rýchlosť rastu.

Grafické znázornenie slúži na kontrolu, či kontrolné kultúry počas testu rastú exponenciálne pri predpokladanej rýchlosti rastu. Kriticky preskúmajte všetky experimentálne body a podobu grafov a skontrolujte prvotné údaje a postupy v prípade možných chýb. Skontrolujte najmä všetky experimentálne údaje, pri ktorých sa predpokladá, že sa odchyľujú v dôsledku systematickej chyby. Ak je zrejmé, že sa chyby v postupe dajú zistiť a/alebo sa pokladajú za vysoko pravdepodobné, konkrétny experimentálny údaj sa označí ako extrémna hodnota a nezahrnie sa do následnej štatistickej analýzy. (Nulová koncentrácia rias v jednej z dvoch alebo troch paralelných nádob môže naznačovať, že nádoba nebola správne inokulovaná alebo nebola riadne vyčistená.) V správe o teste sa musia jasne uviesť dôvody na vyradenie experimentálneho údaju ako extrémnej hodnoty. Prípustnými dôvodmi sú iba (zriedkavo) chyby v postupe a nie nepresnosť. Štatistické postupy v prípade identifikácie extrémnych hodnôt majú obmedzené použitie pre tento typ problému a nemôžu nahradiť odborné posúdenie. Extrémne hodnoty (takto označené) sa musia prednostne ponechať medzi experimentálnymi údajmi uvedenými v každej ďalšej grafickej alebo tabuľkovej prezentácii údajov.

▼M1

2.2. HODNOTY REAKCIE

Cieľom testu je stanoviť účinky testovanej látky na rast rias. Táto testovacia metóda opisuje dve hodnoty reakcie, keďže členské krajiny majú rozdielne preferencie a regulačné požiadavky. Aby boli výsledky testu prijateľné vo všetkých členských krajinách, musia sa vyhodnotiť účinky s použitím oboch hodnôt reakcie a) a b), ktoré sú uvedené nižšie:

a) Priemerná špecifická rýchlosť rastu: táto hodnota reakcie sa vypočíta na základe logaritmického nárastu biomasy počas času testu vyjadreného za deň.

b) Výťažok: touto hodnotou reakcie je množstvo biomasy na konci testu bez počiatočného množstva biomasy.

Na uplatnenie tejto metódy v regulačnom rámci EÚ by sa mal výpočet výsledkov opierať o priemernú špecifickú rýchlosť rastu z ďalej uvedených dôvodov. Je potrebné pripomenúť, že hodnoty toxicity vypočítané s použitím týchto dvoch hodnôt reakcie nie sú porovnateľné a tento rozdiel sa musí zohľadniť pri použití výsledkov testu. EC_x hodnoty založené na priemernej špecifickej rýchlosti rastu (E_rC_x) budú obvykle vyššie ako výsledky založené na výťažku (E_yC_x) pri dodržaní testovacích podmienok tejto testovacej metódy pre matematický základ príslušných metód. Neznamená to rozdiel v citlivosti medzi oboma hodnotami reakcie, ale jednoducho to znamená, že hodnoty sa matematicky odlišujú. Pojem priemerná špecifická rýchlosť rastu je založená na všeobecnom exponenciálnom modele rastu rias v nelimitovaných kultúrach, kde sa toxicita stanovuje na základe účinkov na rýchlosť rastu, bez závislosti od absolútnej úrovne špecifickej rýchlosti rastu kontroly, od klesania krivky reakcie na koncentráciu alebo dĺžky testu. Naopak je to v prípade výsledkov založených na výťažku ako hodnote reakcie, ktoré sú závislé od všetkých týchto ďalších premenných. E_yC_x je závislé od špecifickej rýchlosti rastu druhov rias, ktoré sa používajú v každom teste a od maximálnej špecifickej rýchlosti rastu, ktorá sa môže meniť medzi druhmi a dokonca medzi rozdielnymi kmeňmi rias. Táto hodnota reakcie sa nesmie použiť na porovnanie citlivosti na toxické látky medzi druhmi rias alebo dokonca odlišnými kmeňmi. Zatiaľ čo sa z vedeckého hľadiska na stanovenie toxicity uprednostňuje použitie priemernej špecifickej rýchlosti rastu, aby sa vyhovelo súčasným regulačným požiadavkám v niektorých krajinách, do tejto testovacej metódy sa zahrnulo aj stanovenie toxicity založené na výťažku.

2.2.1. **Priemerná rýchlosť rastu**

Priemerná špecifická rýchlosť rastu pre konkrétny čas sa vypočíta ako logaritmus nárastu biomasy z rovnice pre každú jednotlivú kontrolnú a ošetrenú nádobu:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \quad (\text{deň}^{-1})$$

kde:

μ_{i-j} je priemerná špecifická rýchlosť rastu od času i do j

X_i je biomasa v čase i

X_j je biomasa v čase j.

▼M1

Pre každú ošetrenú a kontrolnú skupinu vypočítajte strednú hodnotu pre rýchlosť rastu spolu s odhadmi variancie.

Vypočítajte priemernú špecifickú rýchlosť rastu počas celej dĺžky testu (obvykle dni 0 – 3) radšej s použitím ako počiatočnej hodnoty nominálne inokulovanej biomasy ako nameranej počiatočnej hodnoty, pretože sa týmto spôsobom obvykle dosahuje väčšia presnosť. Ak použité zariadenie na meranie biomasy umožňuje dostatočne presné stanovenie malého množstva inokula biomasy (napr. prietokový cytometer), potom sa môže použiť nameraná počiatočná koncentrácia biomasy. Tiež stanovte rýchlosti rastu po častiach vypočítané ako špecifické rýchlosti rastu pre každý deň počas priebehu testu (dni 0 – 1, 1 – 2 a 2 – 3) a skontrolujte, či je kontrolná rýchlosť rastu naďalej konštantná (pozri kritériá platnosti, oddiel 1.7). Významne nižšia špecifická rýchlosť rastu v deň jeden ako celková priemerná špecifická rýchlosť rastu môže indikovať lag fázu. Zatiaľ čo lag fázu možno minimalizovať a prakticky eliminovať v kontrolných kultúrach vhodným namnožením prípravnej kultúry, lag fáza v exponovaných kultúrach môže indikovať regeneráciu po pôvodnom toxickom strese alebo zníženú expozíciu pre úbytok testovanej látky (vrátane sorpcie na biomasu rias) po počiatočnej expozícii. Môže sa teda stanoviť rýchlosť rastu po častiach na vyhodnotenie účinkov testovanej látky, ktoré sa vyskytnú počas času expozície. Značné rozdiely medzi rýchlosťou rastu po častiach a priemernou rýchlosťou rastu indikujú odchýlku od konštantného exponenciálneho rastu, a to, že dôkladné preskúmanie rastových kriviek je zabezpečené.

Vypočítajte inhibíciu rýchlosti rastu v percentách pre každú ošetrenú paralelku s pomocou rovnice:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100$$

kde:

$\%I_r$: percentuálna inhibícia priemernej špecifickej rýchlosti rastu

μ_C: stredná hodnota priemernej špecifickej rýchlosti rastu (μ) v kontrolnej skupine

μ_T: priemerná špecifická rýchlosť rastu pre ošetrenú paralelku.

Ak sa použijú rozpúšťadlá na prípravu testovacích roztokov, použijú sa vo výpočte percentuálnej inhibície skôr kontroly s rozpúšťadlom ako kontroly bez rozpúšťadiel.

2.2.2. **Výťažok**

Výťažok sa vypočíta ako množstvo biomasy na konci testu mínus počiatočné množstvo biomasy pre každú jednotlivú kontrolnú a ošetrenú nádobu. Pre každú testovanú koncentráciu a kontrolu vypočítajte strednú hodnotu výťažku spolu s odhadmi variancie. Percentuálna inhibícia výťažku ($\%I_y$) sa môže vypočítať pre každú ošetrenú paralelku takto:

$$\%I_y = \frac{(Y_C - Y_T)}{Y_C} \times 100$$

▼**M1**

kde:

% I_y: percentuálna inhibícia výťažku

Y_C: stredná hodnota výťažku v kontrolnej skupine

Y_T: hodnota výťažku pre ošetrenú paralelku.

2.3. VYTVORENIE KRIVKY REAKCIE NA KONCENTRÁCIU

Zaznamenajte do grafu percento inhibície proti logaritmu koncentrácie testovanej látky a pozorne graf skontrolujte a nezohľadnite žiadny experimentálny údaj, ktorý bol vylúčený v prvej fáze ako extrémna hodnota. Plynulou čiarou spojte body voľne alebo počítačovou interpoláciou na stanovenie prvých výsledkov o vzťahu medzi koncentráciou a reakciou, potom postupujte presnejšou metódou, prednostne výpočtovou štatistickou metódou. V závislosti od plánovaného využitia údajov, kvality (presnosti) a množstva údajov, ako aj dostupnosti nástrojov na analýzu sa môže rozhodnúť (a niekedy odôvodniť) zastaviť v tomto štádiu analýzu údajov a jednoducho odčítať kľúčové hodnoty EC_{50} a EC_{10} (a/alebo EC_{20}) z krivky spojenej voľne (pozri aj nižšie uvedenú časť o stimulačných účinkoch). Platné dôvody na nepoužitie štatistickej metódy môžu zahŕňať toto:

— Údaje nie sú vhodné pre výpočtové metódy, aby poskytli spoľahlivejšie výsledky, ako sa dajú získať odborným posúdením – za takýchto okolností niektoré počítačové programy môžu dokonca poskytnúť nesprávne riešenie (iterácie nesmú konvergovať atď.).

— Reakcie stimulovaného rastu nemožno náležite spracovať s použitím dostupných počítačových programov (pozri nižšie).

2.4. ŠTATISTICKÉ POSTUPY

Cieľom je získať kvantitatívny vzťah medzi koncentráciou a reakciou regresnou analýzou. Možno použiť váženú lineárnu regresiu po uskutočnení linearizovanej transformácie reakčných údajov – napríklad na probitové alebo logitové, alebo Weibullove jednotky (9), alebo sa uprednostňujú techniky nelineárnej regresie, ktorými sa lepšie spracujú nepresnosti údajov, ktorým sa nedá zabrániť, a odchýlky od hladkých rozdelení. Priblížením buď k nulovej, alebo k úplnej inhibícii sa takéto nepresnosti môžu transformáciou zväčšiť a ovplyvniť analýzu (9). Je potrebné pripomenúť, že štandardné metódy analýzy s použitím probitovej, logitovej alebo Weibullovej transformácie sa plánujú na použitie na kvantálne (napr. mortalita alebo prežitie) údaje a musia sa modifikovať, aby sa prispôsobili údajom o raste alebo biomase. Osobitné postupy na stanovenie hodnôt EC_x zo spojitých údajov možno nájsť v (10) (11) a (12). Použitie nelineárnej regresnej analýzy je uvedené ďalej v dodatku 4.

▼M1

Pre každú hodnotu reakcie, ktorá sa má analyzovať, použite vzťah medzi koncentráciou a reakciou na výpočet bodových odhadov hodnôt EC_x. Ak je to možné, je potrebné stanoviť 95 % hranice spoľahlivosti pre každý odhad. Vhodnosť reakčných údajov na regresný model je potrebné vyhodnotiť buď graficky, alebo štatisticky. Regresná analýza sa musí uskutočniť s použitím jednotlivých reakcií paraleliek, nie stredných hodnôt ošetrenej skupiny. Ak je však zostrojenie nelineárnej krivky zložité alebo nemožné pre príliš veľký rozptyl údajov, problému sa dá vyhnúť uskutočnením regresie na skupinovom základe ako praktický spôsob zníženia vplyvu podozrivých extrémnych hodnôt. Použitie tejto možnosti sa musí uviesť v správe z testu ako odchýlka od obvyklého postupu, pretože krivky zostrojené s jednotlivými paralelkami nepriniesli dobrý výsledok.

EC_{50} odhady a hranice spoľahlivosti sa môžu získať aj s použitím lineárnej interpolácie bootstrappingom (13), ak dostupné regresné modely/metódy sú nevhodné pre údaje.

Pre odhad LOEC aj NOEC v prípade účinkov testovanej látky na rýchlosť rastu je potrebné porovnať stredné hodnoty ošetrenej skupiny s použitím techník pre analýzu variancie (ANOVA). Stredná hodnota pre každú koncentráciu sa musí potom porovnať s kontrolnou strednou hodnotou s použitím príslušného viacnásobného porovnania alebo testovacej metódy trendu. Môže sa použiť Dunnettov alebo Williamsov test (14) (15) (16) (17) (18). Je potrebné stanoviť, či je dodržaný ANOVA predpoklad homogenity variancie. Toto stanovenie sa môže uskutočniť graficky alebo oficiálnym testom (18). Vhodný je Levenov alebo Bartlettov test. Nesplnenie predpokladu homogenity variancie sa môže niekedy upraviť logaritmickou transformáciou údajov. Ak je heterogenita variancie extrémna a nedá sa korigovať transformáciou, je potrebné posúdiť analýzu metódami, ako sú napr. „step-down Jonkheere“ testy trendu. Ďalšie informácie o stanovení NOEC možno nájsť v (12).

Najnovší vedecký vývoj vedie k odporúčaniu, aby sa upustilo od koncepcie NOEC a nahradila sa regresiou založenou na bodovom odhade EC_x. Príslušná hodnota pre x pre tento test na riasach nebola stanovená. Rozsah 10 % až 20 % sa zdá byť vhodný (v závislosti od zvolenej hodnoty reakcie) a prednostne sa musí zaznamenať EC_{10} a EC_{20}.

2.5. STIMULÁCIA RASTU

Niekedy sa pri nízkych koncentráciách pozoruje stimulácia rastu (negatívna inhibícia). Môže to byť v dôsledku hormézy („toxickej stimulácie“) alebo pridania stimulujúcich rastových faktorov s testovaným materiálom do použitého minimálneho média. Pamätajte, že pridanie anorganických živín by nemalo mať žiadny priamy účinok, pretože testovacie médium by malo počas testu zachovávať nadbytok živín. Stimuláciu pri nízkych dávkach možno ignorovať pri výpočtoch EC_{50}, pokiaľ nie je extrémna. Ak je však extrémna alebo sa má vypočítať hodnota EC_x pre nízke x, môžu sa vyžadovať osobitné postupy. Malo by sa zabrániť vypusteniu stimulačných reakcií z analýzy údajov, ak je to možné, a ak dostupný softvér na vytvorenie krivky nemôže prijať malú stimuláciu, môže sa použiť lineárna interpolácia bootstrappingom. Ak je stimulácia extrémna, môže sa zvážiť model hormézy (19).

▼**M1**

2.6. NETOXICKÁ INHIBÍCIA RASTU

Testovacie materiály absorbujúce svetlo môžu spôsobiť zníženie rýchlosti rastu, pretože tienenie znižuje množstvo dostupného svetla. Takéto fyzikálne typy účinkov je potrebné oddeliť od toxických účinkov modifikáciou podmienok testu, a to je potrebné osobitne uviesť v správe. Informácie možno nájsť v (2) a (3).

3. **SPRÁVA**

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

— fyzikálny charakter a príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti vrátane limitu rozpustnosti vo vode,

— chemické identifikačné údaje vrátane čistoty.

Testované druhy:

— kmeň, dodávateľ alebo zdroj a použité podmienky kultivácie.

Testovacie podmienky:

— dátum začiatku testu a jeho dĺžka,

— opis testu: testovacie nádoby, objemy kultúr, hustota biomasy na začiatku testu,

— zloženie média,

— testované koncentrácie a paralelky (napr. počet paraleliek, počet testovaných koncentrácií a použitý geometrický rad),

— opis prípravy testovaných roztokov vrátane použitia rozpúšťadiel atď.

— prístroj na kultiváciu,

— intenzita svetla a kvalita (zdroj, homogenita),

— teplota,

— testované koncentrácie: nominálne testované koncentrácie a všetky výsledky analýz na stanovenie koncentrácie testovanej látky v testovacích nádobách. V správe sa musí uviesť výťažnosť a limit kvantifikácie v testovacom matrixe,

— všetky odchýlky od tejto testovacej metódy,

— metódy na stanovenie biomasy a dôkaz vzťahu medzi stanoveným parametrom a sušinou.

Výsledky:

— pH hodnoty na začiatku a na konci testu pri všetkých ošetreniach,

— množstvo biomasy v každej banke v každom meranom bode a metóda merania biomasy,

▼**M1**

— rastové krivky (graf množstva biomasy proti času),

— vypočítané hodnoty reakcie pre každú ošetrenú paralelku so strednými hodnotami a variančným koeficientom v prípade paraleliek,

— grafické znázornenie vzťahu koncentrácie a účinku,

— odhady toxicity pre hodnoty reakcie, napr. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, a sprievodné intervaly spoľahlivosti. Ak sa vypočítavajú, LOEC a NOEC a štatistické metódy použité na ich stanovenie,

— ak sa používa ANOVA, veľkosť účinku, ktorý sa stanovil (napr. najmenej významný rozdiel),

— každá stimulácia rastu zistená v každom ošetrení,

— všetky iné pozorované účinky, napr. morfologické zmeny rias,

— diskusia k výsledkom vrátane každého vplyvu na záver z testu vyplývajúceho z odchýliek od tejto testovacej metódy.

4. POUŽITÁ LITERATÚRA

(1) OECD TG 201 (2006) Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.

(2) ISO 1998: Water quality – Guidance for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water. ISO/DIS 14442.

(3) OECD 2000: Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment, no. 23.

(4) ISO 1998: Water quality – Sampling – Part 16: General Guidance for Biotesting. ISO 5667 – 16.

(5) ISO 1993: Water quality – Algal growth inhibition test. ISO 8692.

(6) Mayer, P., Cuhel, R. and Nyholm, N. (1997). A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests. Water Research 31: 2525 – 2531.

(7) Slovacey, R.E. and Hanna, P.J. In vivo fluorescence determinations of phytoplancton chlorophyll, Limnology & Oceanography 22,5 (1977), pp. 919 – 925.

(8) Simpson, S.L., Roland, M.G.E., Stauber, J.L. and Batley, G.E. (2003) Effect of declining toxicant concentrations on algal bioassay endpoints. Environ. Toxicol. Chem 22, 2073 – 2079.

(9) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, 713 – 718.

▼**M1**

(10) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, 157 – 167.

(11) Bruce, R.D., and Versteeg, D.J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Env. Toxicol. Chem. 11: 1485 – 1494.

(12) OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

(13) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05 – 88. USEPA, Duluth, MN.

(14) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc. 50: 1096 – 1121.

(15) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482 – 491.

(16) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103 – 117.

(17) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510 – 531.

(18) Draper, N.R. and Smith, H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition. Wiley, New York.

(19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93 – 96.

▼M1

Dodatok 1

Kmene, ktoré sa ukázali ako vhodné na účely testu

Zelené riasy

— *Pseudokirchneriella subcapitata* (predtým známa pod názvom *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG,

— *Desmodesmus subspicatus* (predtým známa ako *Scenedesmus subspicatus*), 86.81 SAG.

Rozsievky

— *Navicula pelliculosa*, UTEX 664.

Sinice

— *Anabaena flos-aquae*, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A,

— *Synechococcus leopoliensis*, UTEX 625, CCAP 1405/1.

Zdroje kmeňov

Odporúčané kmene sú dostupné z kultúr s jedným druhom rias z týchto zbierok (v abecednom poradí):

ATCC: American Type Culture Collection

10801 University Boulevard

Manassas, Virginia 20110 – 2209

USA

CCAP, Culture Collection of Algae and Protozoa

Institute of Freshwater Ecology,

Windermere Laboratory

Far Sawrey, Amblerside

Cumbria

LA22 0LP

UK

SAG: Sammlung von Algenkulturen

Albrecht-von-Haller-Institut

Universität Göttingen

Nikolausberger Weg 18

37073 Göttingen

GERMANY

UTEX Culture Collection of Algae

Section of Molecular, Cellular and Developmental Biology

School of Biological Sciences

the University of Texas at Austin

Austin, Texas 78712

USA

▼M1

Vzhľad a charakteristika odporúčaných druhov

	P. subcapitata	*D. subspicatus*	*N. pelliculosa*	*A. flos-aquae*	*S. leopoliensis*
Vzhľad	zakrivené, skrútené samostatné bunky	oválne, väčšinou samostatné bunky	tyčinky	reťazce oválnych buniek	tyčinky
Veľkosť (dl. × š.) µm	8 – 14 × 2 – 3	7 – 15 × 3 – 12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Objem buniek (μm^3/bunku)	40 – 60 (1)	60 – 80 (1)	40 – 50 (1)	30 – 40 (1)	2,5 (2)
Sušina buniek (mg/bunku)	$2 – 3 \times 10^{-8}$	$3 – 4 \times 10^{-8}$	$3 – 4 \times 10^{-8}$	$1 – 2 \times 10^{-8}$	$2 – 3 \times 10^{-9}$
Rýchlosť rastu (1) ($deň^{-1}$)	1,5 – 1,7	1,2 – 1,5	1,4	1,1 – 1,4	2,0 – 2,4

(1) Stanovené elektronickým počítadlom častíc.
(2) Vypočítané z veľkosti.
(3) Najčastejšie pozorovaná rýchlosť rastu v OECD médiu s intenzitou svetla približne 70 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ a 21 °C.

Osobitné odporúčania pre kultiváciu a zaobchádzanie s odporúčanými testovanými druhmi

Pseudokirchneriella subcapitata a Desmodesmus subspicatus

Tieto zelené riasy sa obvykle ľahko uchovávajú v rôznych kultivačných médiách. Informácie týkajúce sa vhodných médií sú dostupné zo zbierok kultúr. Bunky sú obvykle samostatné, bunková hustota sa stanovuje jednoducho s použitím elektronického počítadla častíc alebo mikroskopu.

Anabaena flos-aquae

Na uchovávanie zásobnej kultúry sa môžu použiť rôzne rastové médiá. Je mimoriadne dôležité, aby sa pri obnovovaní zabránilo jednorazovej kultúre prekročiť log fázy rastu, v tomto bode je obnova zložitá.

Anabaena flos-aquae vytvára zhluky spletených reťazcov buniek. Veľkosť týchto zhlukov sa môže meniť podľa podmienok kultivácie. Môže byť potrebné rozdeliť tieto zhluky pri počítaní pomocou mikroskopu alebo elektronického počítadla častíc, ktoré sa použije na stanovenie množstva biomasy.

Môže sa použiť sonifikácia častí vzoriek na rozbitie reťazcov, aby sa znížila variabilita počtu buniek. Dlhšia sonifikácia, ako sa vyžaduje na rozbitie reťazcov na kratšie úseky, môže poškodiť bunky. Intenzita sonifikácie a jej trvanie musia byť rovnaké pri každom spracovaní.

Spočítajte dostatočné množstvo políčok na hemocytometri (minimálne 400 buniek) na elimináciu variability. Tým sa zlepší spoľahlivosť mikroskopického stanovenia hustoty.

Elektronické počítadlo častíc sa môže použiť na stanovenie celkového objemu buniek druhu *Anabaena* po rozbití reťazcov buniek opatrnou sonifikáciou. Je potrebné prispôsobiť silu sonifikácie, aby sa zabránilo rozbitiu buniek.

Použite vortexový mixér alebo podobnú vhodnú metódu na zabezpečenie toho, že suspenzia rias, ktorá sa použije na inokuláciu testovacích nádob je dobre premiešaná a homogénna.

▼**M1**

Testovacie nádoby sa musia umiestniť na orbitálnu trepačku s platformou približne pri 150 otáčkach za minútu. Alternatívne sa môže použiť občasné miešanie na zníženie tvorby zhlukov druhu *Anabaena*. Ak sa vyskytne zhlukovanie, je potrebné venovať pozornosť tomu, aby sa dosiahli reprezentatívne vzorky na stanovenie množstva biomasy. Môže byť potrebné prudké premiešanie pred odberom vzoriek, aby sa rozbili zhluky rias.

Synechococcus leopoliensis

Na uchovávanie zásobnej kultúry sa môžu použiť rôzne rastové médiá. Informácie týkajúce sa vhodných médií sú dostupné zo zbierok kultúr.

Synechococcus leopoliensis rastie vo forme samostatných tyčinkovitých buniek. Bunky sú veľmi malé, čo sťažuje použitie počítania pomocou mikroskopu pri stanovovaní množstva biomasy. Užitočné sú elektronické počítadlá častíc vybavené na počítanie menších častíc až veľkosti približne 1 μm. Vhodné sú tiež fluorometrické merania *in vitro*.

Navicula pelliculosa

Na uchovávanie zásobnej kultúry sa môžu použiť rôzne rastové médiá. Informácie týkajúce sa vhodných médií sú dostupné zo zbierok kultúr. Pamätajte, že do média je potrebné pridať kremičitan.

Navicula pelliculosa môže za určitých rastových podmienok tvoriť zhluky. Kvôli produkcii lipidov majú bunky rias niekedy tendenciu akumulovať vo forme povrchového filmu. Za týchto okolností je potrebné prijať osobitné opatrenia pri odoberaní čiastočných vzoriek na stanovenie množstva biomasy, aby bolo možné získať reprezentatívne vzorky. Môže byť potrebné prudké premiešanie, napr. s použitím vortexového mixéra.

▼M1

Dodatok 2

Rastové médiá

Môže sa použiť jedno z týchto rastových médií:

MédiumOECD: Pôvodné médium OECD TG 201, tiež podľa ISO 8692.

US EPA médium AAP, tiež podľa ASTM.

Pri príprave týchto médií sa musí použiť činidlo alebo chemické látky analytickej kvality a deionizovaná voda.

Zloženie média AAP (US. EPA) a média OECD TG 201.

Zložka	EPA		OECD	
	mg/l	mM	mg/l	mM
$NaHCO_3$	15,0	0,179	50,0	0,595
$NaNO_3$	25,5	0,300		
NH_4Cl			15,0	0,280
$MgCl_2 \cdot 6(H_2O)$	12,16	0,0598	12,0	0,0590
$CaCl_2 \cdot 2(H_2O)$	4,41	0,0300	18,0	0,122
$MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K_2HPO_4	1,044	0,00599		
KH_2PO_4			1,60	0,00919
$FeCl_3 \cdot 6(H_2O)$	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
$Na_2EDTA \cdot 2(H_2O)$	0,300	0,000806	0,100	0,000269 (*)
H_3BO_3	0,186	0,00300	0,185	0,00299
$MnCl_2 \cdot 4(H_2O)$	0,415	0,00201	0,415	0,00210
$ZnCl_2$	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
$CoCl_2 \cdot 6(H_2O)$	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
$Na_2MoO_4 \cdot 2(H_2O)$	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
$CuCl_2.2(H_2O)$	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

(*) Molárny pomer EDTA a železa je mierne vyšší ako jeden. Zabraňuje to vyzrážaniu železa a zároveň sa minimalizuje chelácia ťažkých kovov.

V teste s rozsievkou *Navicula pelliculosa* sa musí k obidvom médiám pridať $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$, aby sa dosiahla koncentrácia 1,4 mg Si/l.

pH média sa dosiahne rovnováhou medzi uhličitanovým systémom média a parciálnym tlakom CO_2 v okolitom vzduchu. Približný vzťah medzi pH pri 25 °C a molárnou koncentráciou hydrogenuhličitanu je:

$$PH_{eq} = 11,30 + \log [HCO_3]$$

▼M1

15 mg/l $NaHCO_3$, pH_{eq} = 7,5 (U.S. EPA médium) alebo 50 mg $NaHCO_3$/l, pH_{eq} = 8.1 (médium OECD).

Zloženie prvkov v testovacom médiu

Prvok	EPA	OECD
	mg/l	mg/l
C	2,144	7,148
N	4,202	3,927
P	0,186	0,285
K	0,469	0,459
Na	11,044	13,704
Ca	1,202	4,905
Mg	2,909	2,913
Fe	0,033	0,017
Mn	0,115	0,115

Príprava média OECD

Živina	Koncentrácia v zásobnom roztoku
Zásobný roztok 1: makroživiny	
NH_4Cl	1,5 $g \cdot l^{-1}$
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,2 $g \cdot l^{-1}$
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,8 $g \cdot l^{-1}$
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,5 $g \cdot l^{-1}$
KH_2PO_4	0,16 $g \cdot l^{-1}$
Zásobný roztok 2: železo	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	64 $mg \cdot l^{-1}$
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	100 $mg \cdot l^{-1}$
Zásobný roztok 3: stopové prvky	
H_3BO_3	185 $mg \cdot l^{-1}$
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415 $mg \cdot l^{-1}$
$ZnCl_2$	3 $mg \cdot l^{-1}$
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,5 $mg \cdot l^{-1}$
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,01 $mg \cdot l^{-1}$
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7 $mg \cdot l^{-1}$
Zásobný roztok 4: hydrogenuhličitan	
$NaHCO_3$ $Na_2SiO_3 \cdot 9H_20$	50 $g \cdot l^{-1}$

Zásobné roztoky sterilizujte membránovou filtráciou (stredný priemer pórov 0,2 μm) alebo autoklávovaním (120 °C, 15 min). Skladujte roztoky v tme pri 4 °C.

Zásobné roztoky 2 a 4 neautoklávujte, ale sterilizujte ich membránovou filtráciou.

▼**M1**

Pripravte rastové médium pridaním príslušného objemu zásobných roztokov 1 – 4 do vody:

Pridajte do 500 ml sterilizovanej vody:

— 10 ml zásobného roztoku 1

— 1 ml zásobného roztoku 2

— 1 ml zásobného roztoku 3

— 1 ml zásobného roztoku 4.

Doplňte do 1 000 ml sterilizovanou vodou.

Poskytnite dostatočný čas na vyrovnanie média s atmosférickým CO_2, v prípade potreby prebublaním sterilným filtrovaným vzduchom niekoľko hodín.

Príprava média AAP

A1.1. Pridajte 1 ml každého zásobného roztoku v A1.2.1 – A1.2.7 do približne 900 ml deionizovanej alebo destilovanej vody a potom zrieďte na 1 l.

A1.2. Zásobné roztoky makroživín sa pripravujú rozpustením týchto látok v 500 ml deionizovanej alebo destilovanej vody. Činidlá A1.2.1, A1.2.2, A1.2.3, a A1.2.4 možno spojiť do jedného zásobného roztoku.

A1.2.1. $NaNO_3$ – 12,750 g.

A1.2.2. $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ – 6,082 g.

A1.2.3. $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 2,205 g.

A1.2.4. *Zásobný roztok mikroživín* – (pozri A1.3).

A1.2.5. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 7,350 g.

A1.2.6. K_2HPO_4 – 0,522 g.

A1.2.7. $NaHCO_3$ – 7,500 g.

A1.2.8. $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ – pozri poznámku A1.1.

Poznámka A1.1. – Používajte iba pre testovacie druhy rozsievok. Môže sa pridať priamo (202,4 mg) alebo prostredníctvom zásobného roztoku, aby sa dosiahla konečná koncentrácia Si v médiu 20 mg/l.

A1.3. Zásobný roztok mikroživín sa pripravuje rozpustením týchto látok v 500 ml deionizovanej alebo destilovanej vody:

A1.3.1. H_3BO_3 – 92,760 mg.

A1.3.2. $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ – 207,690 mg.

A1.3.3. $ZnCl_2$ – 1,635 mg.

A1.3.4. $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ – 79,880 mg.

A1.3.5. $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0,714 mg.

A1.3.6. $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ – 3,630 mg.

A1.3.7. $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0,006 mg.

A1.3.8. $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$ – 150,000 mg.

[dinátrium (etyléndinitrilo) tetraacetát].

▼**M1**

A1.3.9. $Na_2SeO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,005 mg. Pozri poznámku A1.2.

Poznámka A1.2. – Používajte iba v médiu pre zásobné roztoky kultúry druhov rozsievok.

A1.4. Upravte pH na 7,5 ± 0,1 pridaním 0,1 *N* alebo 1,0 *N* NaOH, alebo HCl.

A1.5. Prefiltrujte médium do sterilnej nádoby cez 0,22-µm membránový filter, ak sa má používať počítač častíc, alebo cez 0,45-µm filter v prípade, že sa počítač častíc nepoužíva.

A1.6. Uchovávajte médium až do použitia v tme pri teplote približne 4 °C.

▼M1

Dodatok 3

Vzor postupu kultivácie rias

Všeobecné pozorovania

Účelom kultivácie podľa tohto postupu je získať kultúry rias na testovanie toxicity.

Musia sa použiť vhodné metódy na zabezpečenie, aby kultúry rias neboli infikované baktériami. Axenické kultúry môžu byť vhodné, ale sú potrebné kultúry s jedným druhom rias.

Všetky činnosti by sa mali vykonávať pri sterilných podmienkach, aby sa zamedzilo kontaminácii baktériami a inými riasami.

Prístroje a materiály

Pozri v časti Testovacia metóda: Prístroje.

Postupy na získanie kultúr rias

Príprava živných roztokov (médií):

Všetky živné soli média sa pripravia ako koncentrované zásobné roztoky a skladujú sa v tme a chlade. Tieto roztoky sa sterilizujú filtráciou alebo autoklávovaním.

Médium sa pripraví pridaním správneho množstva zásobného roztoku do sterilnej destilovanej vody, pozorne, aby sa zabránilo infekcii. V prípade tuhého média sa pridá 0,8 % agaru.

Zásobná kultúra:

Zásobné kultúry sú malé kultúry rias, ktoré sa pravidelne prenášajú do čerstvého média, aby sa použili ako počiatočný testovací materiál. Ak sa kultúry nepoužívajú pravidelne, naočkujú sa do skúmaviek na šikmý agar. Potom sa aspoň raz za dva mesiace prenesú do čerstvého média.

Zásobné kultúry sa kultivujú v kónických bankách obsahujúcich vhodné médium (objem okolo 100 ml). Ak sa riasy inkubujú pri 20 °C pri kontinuálnom osvetlení, je potrebný prenos raz týždenne.

Prenesie sa také množstvo „starej“ kultúry sterilnou pipetou do banky s čerstvým médiom, aby počiatočná koncentrácia rýchlo rastúceho druhu bola asi 100-násobne menšia ako v starej kultúre.

Stupeň rastu druhu sa môže stanoviť z rastovej krivky. Ak je toto známe, možno určiť hustotu, pri ktorej by sa mala kultúra preniesť do nového média. To sa musí vykonať skôr, ako kultúra dosiahne stacionárnu fázu rastu.

Prípravná kultúra:

Prípravná kultúra je určená na to, aby poskytla potrebné množstvo rias na inokuláciu testovaných kultúr. Prípravná kultúra sa inkubuje pri testovacích podmienkach a použije sa, pokiaľ je ešte v exponenciálnom raste, normálne po inkubačnom čase 2 až 4 dni. Kultúry rias obsahujúce deformované alebo abnormálne bunky sa musia odstrániť.

▼M1

Dodatok 4

Analýza údajov nelineárnou regresiou

Všeobecné aspekty

Reakcia v testoch na riasach a iných testoch mikrobiálneho rastu – rast biomasy je svojím charakterom kontinuálna alebo metrická premenná – rýchlosť procesu, ak sa použije rýchlosť rastu, a jeho časový integrál, ak sa zvolí biomasa. Obidva sa vzťahujú na zodpovedajúcu strednú hodnotu reakcie paralelných neexponovaných kontrol, ktoré vykazujú maximálnu reakciu za podmienok, ktorým sú vystavené, pričom svetlo a teplota sú v teste na riasach primárnymi určujúcim faktormi. Systém je distribuovaný alebo homogénny a na biomasu sa môže nahliadať ako na kontinuum, pričom sa nezohľadňujú jednotlivé bunky. Rozdelenie variancie typu odpovede v prípade takéhoto systému sa vzťahuje iba na experimentálne faktory (obvykle opísané ako logaritmickonormálne alebo normálne rozdelenia chyby). Čo je opakom typických reakcií pri biologických skúškach s kvantálnymi údajmi, pre ktoré sa tolerancia (typicky binomicky rozdelená) jednotlivých organizmov často pokladá za dominantný variančný komponent. Reakcie kontrol tu majú hodnotu nula alebo hodnotu pozadia.

V podmienkach bez výskytu komplikácií normalizovaná alebo relatívna reakcia r monotónne klesá z 1 (nulová inhibícia) k 0 (100 % inhibícia). Pamätajte, že so všetkými reakciami sa spája chyba a že zjavné negatívne inhibície možno vypočítať iba ako výsledok náhodnej chyby.

Regresná analýza

Modely

Regresná analýza sa zameriava na kvantitatívny opis krivky reakcie na koncentráciu vo forme matematickej regresnej funkcie $Y = f(C)$ alebo častejšie $F(Z)$ kde $Z = \log C$. Inverzné použitie $C = f^{-1}(Y)$ umožňuje výpočet hodnôt EC_x vrátane EC_{50}, EC_{10} a EC_{20} a ich 95 % limity spoľahlivosti. Niektoré jednoduché matematické formy funkcií dokážu úspešne opísať vzťahy medzi koncentráciou a reakciou získané na základe testov inhibície rastu rias. Funkcie zahŕňajú napríklad logaritmickú rovnicu, nesymetrickú Weibullovu rovnicu a logaritmickonormálnu rozdeľovaciu funkciu, z ktorých všetky tvoria sigmoidné krivky asymptoticky sa približujúce k jednej pre $C \rightarrow 0$ a nule pre $C \rightarrow$ nekonečno.

Použitie kontinuálnych modelov prahových funkcií (napr. Koymanov model „pre inhibíciu populačného rastu“, Kooijman a kol., 1996) je najnovším návrhom alebo alternatívou asymptotických modelov. Pri tomto modeli sa nepredpokladajú účinky pri koncentráciách pod určitou prahovou hodnotou, EC0+, ktorá sa odhadne pomocou extrapolácie vzťahu reakcie na koncentráciu, aby preťala os koncentrácie s použitím jednoduchej kontinuálnej funkcie, ktorá v počiatočnom bode nie je diferenciovateľná.

Pamätajte, že analýza môže byť jednoduchou minimalizáciou súčtov reziduálnych štvorcov (za predpokladu konštantnej variancie) alebo vážených štvorcov, ak je heterogenita variancie kompenzovaná.

▼M1

Postup

Možno uviesť nasledujúci postup: zvoľte príslušnú rovnicu funkcie Y = f (C) a aproximujte ju na údaje nelineárnou regresiou. Uprednostnite využitie meraní z každej jednotlivej banky skôr ako stredné hodnoty paraleliek, aby sa z údajov získalo čo najviac informácií. Ak je variancia vysoká, na druhej strane z praktických skúseností vyplýva, že stredné hodnoty paraleliek môžu poskytnúť lepší matematický odhad, menej ovplyvnený náhodnými chybami v údajoch, ako v prípade každého jednotlivého experimentálneho bodu.

Zaznamenajte aproximovanú krivku a namerané údaje a skontrolujte, či je preloženie krivky správne. Analýza rezíduí môže byť obzvlášť užitočným nástrojom na tento účel. Ak zvolený funkčný vzťah použitý na reakciu na koncentráciu neopisuje dobre celú krivku alebo niektorú jej dôležitú časť, ako napr. reakcie pri nízkych koncentráciách, zvoľte inú možnosť aproximácie krivky – napr. nesymetrickú krivku ako Weibullovu funkciu namiesto symetrickej krivky. Negatívne inhibície môžu byť problémom napríklad pre log-normálnu rozdeľovaciu funkciu, ktorá takisto vyžaduje alternatívnu regresnú funkciu. Neodporúča sa priradiť nulu ani malú kladnú hodnotu k takýmto záporným hodnotám, pretože to skresľuje rozdelenie chýb. Môže byť vhodné vyhotoviť samostatné aproximácie krivky na častiach krivky, ako napr. časť nízkej inhibície na odhad hodnôt $EC_{low\ x}$. Vypočítajte z použitej rovnice [„inverzným odhadom“, $C = f^{-1}(Y)$, charakteristické bodové odhady EC_x] a zaznamenajte ako minimálne EC_{50} a jeden alebo dva odhady $EC_{low\ x}$. Zo skúseností z praktického testovania vyplýva, že presnosť testu na riasach obvykle umožňuje primerane presný odhad pri 10 % úrovni inhibície, ak je dostatok experimentálnych bodov – pokiaľ sa nevyskytne stimulácia pri nízkych koncentráciách ako faktor spôsobujúci zmätok. Presnosť odhadu EC_{20} je často podstatne lepšia ako EC_{10}, pretože EC_{20} je obvykle umiestnené na približne lineárnej časti centrálnej krivky reakcie na koncentráciu. Niekedy môže byť ťažké interpretovať EC_{10} pre stimuláciu rastu. Preto sa odporúča, aj keď sa EC_{10} dá normálne získať s dostatočnou presnosťou, zaznamenať vždy aj EC_{20}.

Váhové faktory

Experimentálna variancia nie je spravidla konštantná a obvykle zahŕňa proporcionálnu zložku, preto je výhodné bežne vykonávať váženú regresiu. Vážené faktory pre takúto analýzu sa zvyčajne pokladajú za inverzne proporcionálne k variancii:

$$W_i = 1/Var(r_i)$$

Mnohé regresné programy povoľujú možnosť analýzy váženou regresiou s váženými faktormi uvedenými v tabuľke. Obvykle sa musia vážené faktory normalizovať tak, že sa vynásobia $n/\sum w_i$ (n je počet experimentálnych údajov) tak, aby sa ich súčet rovnal jednej.

Normalizované reakcie

Normalizovanie strednou hodnotou reakcie kontroly skrýva niektoré zásadné problémy a spôsobuje pomerne komplikovanú štruktúru variancie. Vydelením reakcií strednou hodnotou reakcie kontroly, aby sa získala percentuálna hodnota inhibície, sa zavádza ďalšia chyba zapríčinená chybou strednej hodnoty. Pokiaľ táto chyba nie je zanedbateľne malá, musia sa opraviť váhové faktory v regresii a musia sa opraviť hranice spoľahlivosti na kovarianciu s kontrolou (17). Pamätajte, že vysoká presnosť odhadovanej strednej hodnoty reakcie kontroly je dôležitá, aby sa minimalizovala celková variancia pre relatívnu reakciu. Táto variancia je takáto:

▼M1

index i sa vzťahuje na úroveň koncentrácie i a index 0 na kontroly:

$$Y_i = \text{relatívna reakcia} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

s varianciou:

$$\text{Var}(Y_i) = \text{Var}(r_i/r_0) \cong (\partial Y_i / \partial r_i)^2 \cdot \text{Var}(r_i) + (\partial Y_i / \partial r_0)^2 \cdot \text{Var}(r_0),$$

a pretože

$$(\partial Y_i / \partial r_i) = 1/r_0 \text{ a } (\partial Y_i / \partial r_0) = r_i/r_0^2$$

s normálne rozdelenými údajmi a paralelami m_i a m_0:

$$\text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$$

celková variancia relatívnej reakcie, Y_i je teda:

$$\text{Var}(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2\ m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4\ m_0$$

Chyba strednej hodnoty kontroly je inverzne proporcionálna k druhej odmocnine počtu paralelných kontrol spriemerovaných a niekedy môže byť opodstatnené zahrnúť predchádzajúce údaje a týmto spôsobom vo veľkej miere znížiť chybu. Alternatívny postup je nenormalizovať údaje a aproximovať absolútne reakcie vrátane údajov o reakcii kontroly, ale zavedením hodnoty reakcie kontroly ako ďalšieho parametra na použitie nelineárnou regresiou. Regresná rovnica má obvykle 2 parametre, táto metóda vyžaduje 3 parametre, a preto je potrebných viac experimentálnych údajov ako nelineárna regresia na údaje, ktoré sú normalizované pri použití vopred nastavenej reakcie kontroly.

Intervaly inverznej spoľahlivosti

Výpočet intervalov spoľahlivosti nelineárnej regresie inverzným odhadom je pomerne zložitý a nie je dostupnou štandardnou voľbou v bežných počítačových štatistických programových balíkoch. Približné limity spoľahlivosti sa môžu získať so štandardnými programami nelineárnej regresie s reparametrizáciou (Bruce a Versteeg, 1992), ktorá zahŕňa prepísanie matematickej rovnice požadovanými bodovými odhadmi, napr. EC_{10} a EC_{50} ako parametre, ktoré sa majú odhadnúť. [Ponechajte funkciu I = f (α, β, koncentrácia) a použite definičné vzťahy f (α, β, EC_{10}) = 0,1 a f (α, β, EC_{50}) = 0,5 na nahradenie f (α, β koncentrácia) ekvivalentnou funkciou g (EC_{10}, EC_{50}, koncentrácia.]

Priamejší výpočet (Andersen a kol., 1998) sa uskutoční ponechaním pôvodnej rovnice s použitím Taylorovho rozvoja okolo stredných hodnôt r_i a r_0.

V poslednom čase sú obľúbené „metódy boot strap“. Tieto metódy používajú stanovené údaje a generátor náhodných čísel riadeného častého opätovného odberu vzoriek na odhad empirického rozdelenia variancie.

Použitá literatúra

Kooijman, S.A.L.M.; Hanstveit, A.O.; Nyholm, N. (1996): No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. Water Research, 30, 1625 – 1632.

Bruce, R.D. and Versteeg, D.J.(1992) A Statistical Procedure for Modelling Continuous Ecotoxicity Data. Env. Toxicol. Chem.11, 1485 – 1494.

Andersen, J.S., Holst, H., Spliid, H., Andersen, H., Baun, A. & Nyholm, N. (1998): Continuous ecotoxicological data evaluated relative to a control response. Journal of Agricultural, Biological and Environmental Statistics, 3, 405 – 420.

▼B

C.4. **STANOVENIE „ĽAHKEJ“ BIODEGRADOVATEĽNOSTI**

ČASŤ I. **VŠEOBECNÉ ÚVAHY**

1.1. ÚVOD

Opísaných je šesť metód, ktoré umožňujú skríning látok a prípravkov na ľahkú biodegradovateľnosť v aeróbnom vodnom médiu:

a) Úbytok rozpusteného organického uhlíka (DOC) Die-Away (metóda C.4-A).

b) Modifikovaný skríningový test podľa OECD – DOC Die-Away (metóda C.4-B).

c) Vývoj oxidu uhličitého (CO_2) (modifikovaný Sturmov test) (metóda C.4-C).

d) Manometrická respirometria (metóda C.4-D).

e) Test uzavretej fľaše (metóda C.4-E).

f) MITI (Ministerstvo medzinárodného obchodu a priemyslu – Japonsko) (metóda C.4-F).

Všeobecné zamerania všetkých šiestich testov sú uvedené v časti I metódy. Položky, ktoré sú špecifické pre jednotlivé metódy, sú uvedené v častiach II až VII. Prílohy obsahujú pojmy, vzorce a návody.

Medzilaboratórny porovnávací test OECD, vykonaný v roku 1988, ukázal, že metódy poskytujú zhodné výsledky. V závislosti od fyzikálneho charakteru látky, ktorá má byť testovaná, sa však môže dávať prednosť určitej metóde.

1.2. VÝBER VHODNEJ SKÚŠOBNEJ METÓDY

Informácie o rozpustnosti látky alebo prípravku, tlaku pár a adsorpčných charakteristikách sú nevyhnutné pri výbere najvhodnejšej metódy. Mal by byť známy chemický vzorec alebo štruktúra, aby sa dali vypočítať a/alebo skontrolovať namerané hodnoty parametrov, napr. ThOD, $ThCO_2$, DOC, TOC, COD (pozri prílohy I a II).

Testované chemické látky, ktoré sú rozpustné vo vode v koncentrácii aspoň 100 mg/l sa môžu hodnotiť všetkými metódami, pokiaľ nie sú prchavé a neadsorbujú sa. Pre látky alebo prípravky, ktoré sú slabo rozpustné vo vode, prchavé alebo sa adsorbujú, sú vhodné metódy uvedené v tabuľke č. 1. Spôsob, akým sa má zaobchádzať so slabo rozpustnými a prchavými látkami alebo prchavými prípravkami je opísaný v dodatku 3. Stredne prchavé látky alebo prchavé prípravky sa môžu testovať DOC Die-Away metódou, ak sa zabezpečí dostatok priestoru pre plynnú fázu v skúšobných nádobách (ktoré by mali byť vhodne uzavreté). V takomto prípade sa musí vykonať abiotická kontrola umožňujúca zistenie fyzikálnych strát.

▼B

Tabuľka 1

Aplikovateľnosť skúšobných metód

Test	Analytická metóda	Vhodnosť pre chemické látky, ktoré sú:		
		slabo rozpustné	prchavé	adsorbujúce
DOC. Die Away	rozpustený organický ublík	—	—	+/-
modifikovaný OECD Die-Away	rozpustený organický uhlík	—	—	+/-
vývoj CO_2	respirometria: uvoľňovanie CO_2	+	—	+
manometricka respirometria	manometrická respirometria: spotreba kyslíka	+	+/-	+
uzavretá fľaša	Respirometria: rozpustený kyslík	+/-	+	+
MITI	respirometria: spotreba kyslíka	+	+/-	+

Na interpretáciu získaných výsledkov sa požadujú informácie o čistote alebo relatívnom zastúpení jednotlivých zložiek testovaného materiálu, obzvlášť keď sú výsledky malé alebo na okraji detekcie.

Informácie týkajúce sa toxicity testovanej látky alebo prípravku pre baktérie (dodatok 4) môžu byť veľmi užitočné pri výbere vhodných testovaných koncentrácii a môžu byť nevyhnutné pre správnu interpretáciu nízkych hodnôt biodegradácie.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Na účely kontroly postupu sa testujú referenčné látky alebo prípravky, ktoré spĺňajú kritériá ľahkej biodegradovateľnosti, ich zaradením vo vhodnej banke paralelne k normálnemu testu.

Vhodnými látkami sú: anilín (čerstvo destilovaný), octan sodný, benzoan sodný. Tieto referenčné látky sa degradujú v týchto metódach, a to aj v prípade, ak sa úmyselne nepridalo inokulum.

Odporúča sa, aby za referenčnú látku bola vyhľadaná taká, ktorá je ľahko biodegradovateľná, ale vyžaduje prídavok inokula. Navrhnutý bol hydroftalát draselný, ale je potrebné získať viac informácií o tejto látke, skôr ako môže byť prijatá za referenčnú látku.

Pri respirometrických testoch môže byť ovplyvnená spotreba kyslíka látkami obsahujúcimi dusík procesom nitrifikácie (pozri prílohy II a V).

4. PRINCÍP SKÚŠOBNÝCH METÓD

Roztok alebo suspenzia testovanej látky v minerálnom médiu sa inokuluje a inkubuje v aeróbnych podmienkach v tme alebo za rozptýleného svetla. Množstvo DOC v testovanom roztoku by sa vzhľadom na inokulum malo udržiavať tak nízko, ako je to len možné v porovnaní s množstvom DOC vzhľadom na testovanú látku. Berie sa zreteľ na endogénnu aktivitu inokula tým, že sa vykonajú paralelne slepé testy s inokulom, ale bez testovanej látky, hoci endogénna aktivita buniek v prítomnosti látky nebude presne súhlasiť s endogénnou aktivitou v kontrole. Referenčná látka sa testuje paralelne, aby sa kontrolovala činnosť postupov.

▼B

Degradácia sa vo všeobecnosti sleduje stanovením parametrov, ako sú DOC, tvorba CO_2 a spotreba kyslíka, a merania sa vykonávajú v dostatočných časových intervaloch, aby to umožnilo identifikovať začiatok a koniec biodegradácie. Pri použití automatických respirometrov je meranie kontinuálne. Hodnota DOC sa niekedy meria navyše k inému parametru, ale zvyčajne sa to robí len na začiatku a na konci testu. Takisto sa môžu použiťšpecifické chemické analýzy na hodnotenie primárnej degradácie testovanej látky a stanovenie koncentrácie akéhokoľvek vzniknutého medziproduktu (povinné v MITI teste).

Test trvá za normálnych okolností 28 dní. Test sa však môže ukončiť pred uplynutím 28 dní, ak biodegradačná krivka dosiahla stacionárnu úroveň aspoň pri troch stanoveniach. Testy sa tiež môžu predĺžiť, ak z tvaru krivky vyplýva, že biodegradácia sa síce začala, ale ešte nedosiahla stacionárnu úroveň na 28. deň.

I.5. KRITÉRIÁ KVALITY

I.5.1. **Reprodukovateľnosť**

Stanovenia by sa mali vykonať aspoň v dvoch paralelkách, a to kvôli charakteru biodegradácie a zmesových bakteriálnych kultúr použitých ako inokulum.

Je všeobecnou skúsenosťou, že čím väčšia koncentrácia mikroorganizmov sa na začiatku pridá k skúšobnému médiu, tým menšie rozdiely sú medzi paralelkami. Kruhové testy ukázali, že môže dochádzať k veľkým rozdielom medzi výsledkami získanými v rôznych laboratóriách, ale normálne je dobrá zhoda v prípade ľahko biodegradovateľných látok.

I.5.2. **Platnosť testu**

Test sa považuje za platný, ak rozdiely extrémnych hodnôt paraleliek pri odstránení testovanej látky alebo prípravku na stacionárnej úrovni na konci testu alebo na konci 10-dňového okna sú menšie ako 20 % a ak percentuálna degradovateľnosť referenčnej látky dosiahla úroveň ľahkej biodegradovateľnosti do 14 dní. Ak sa jedna z týchto podmienok nedodrží, test by sa mal zopakovať. Vzhľadom na presnosť metód nízke hodnoty nemusia nutne znamenať, že testovaná látka nie je biodegradovateľná v environmentálnych podmienkach, ale indikovať, že je potrebné vykonať viac práce pri stanovení biodegradability.

Ak v teste toxicity, obsahujúcom testovanú látku a referenčnú látku alebo prípravok, dôjde k menej ako 35 % degradácii (na základe DOC) alebo menej ako 25 % (na základe ThOD alebo $ThCO_2$) počas 14 dní, testovaná látka alebo prípravok sa môže považovať za inhibujúce (pozri tiež prílohu IV). Testované série by sa mali zopakovať, ak možno použiť nižšie koncentrácie testovanej látky alebo prípravku a/alebo vyššie koncentrácie inokula, ale nie vyššie ako 30 mg tuhých látok/liter.

I.6. VŠEOBECNÉ POSTUPY A PRÍPRAVA

Všeobecné podmienky aplikované na testy sú sumarizované v tabuľke 2. Prístroje a ostatné experimentálne podmienky, špecificky prináležiace k jednotlivým testom, sú opísané neskôr pod hlavičkou pre daný test.

▼B

Tabuľka 2

Podmienky skúšania

Test	Test Die-Away	Vývoj CO_2	Manometrická respirometria	Modifikovaný skrínigový test OECD	Uzavretá fľaša	MITI (I)
Koncentrácia testovanej látky						
v mg/liter			100		2-10	100
mg DOC/liter	10 – 40	10 – 20		10 – 40		
mg TSP/liter			50 – 100		5 – 10	
Koncentrácia inokula (v bunkách/liter približne)	≤ 30 mg/liter SS alebo ≤ 100 ml eluátu na l (10^7 – 10^8)			0,5 ml sekundárneho eluátu na liter (10^5)	≤ 5 ml eluátu na liter (10^4 – 10^6)	30 mg na liter SS (10^7 – 10^8)
Koncentrácia prvkov v minerálnom médiu (mg/liter)						
P	116				11,6	29
N	1,3				0,13	1,3
Na	86				8,6	17,2
K	122				12,2	36,5
Mg	2,2				2,2	6,6
Ca	9,9				9,9	29,7
Fe	0,05 – 0,1				0,05 – 0,1	0,15
pH	7,4 ± 0,2					podl'a možnosti 7,0
Teplota	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C

DOC = rozpustený organický kyslík ThoD = teoretická potreba kyslíka SS = suspendované pevné látky

I.6.1. **Voda na prípravu roztokov**

Používa sa deionizovaná alebo destilovaná voda neobsahujúca inhibičné koncentrácie toxických látok (napr. ióny Cu^{++}). Musí obsahovať menej ako 10 % organického uhlíka, ktorý sa nachádza v testovanom materiáli. Vysoká čistota skúšobnej vody je nevyhnutná, aby sa eliminovali vysoké hodnoty slepého pokusu. Kontaminácia môže pochádzať z vnútorných nečistôt, iontomeniča a lyzovaných baktérii a rias. Pre každú sériu testov použite len úplne totožnú vodu z jednej sady, ktorá je skontrolovaná analýzou DOC. Takáto kontrola nie je nutná pri teste uzavretej fľaše, ale spotreba kyslíka vo vode musí byť nízka.

▼B

I.6.2. **Zásobné roztoky minerálnych zložiek**

Na prípravu skúšobných roztokov sa pripravia zásobné roztoky minerálnych zložiek vhodnej koncentrácie. Tieto zásobné roztoky sa môžu použiť (pri rozdielnych faktoroch zriedenia) pre metódy DOC Die-Away, modifikovaného skríningového testu OECD, vývoja CO_2, manometrickej respirácie, testu uzavretej fľaše.

Zrieďovacie faktory a špecifická príprava minerálneho média pre test MITI sú uvedené pod hlavičkou špecifických testov.

Zásobné roztoky

Pripravia sa tieto zásobné roztoky s použitím reagentov analytickej čistoty.

a) Dihydrogenfosforečňan draselný, KH_2PO_4 8,50 g

Hydrogénfosforečnan didraselný, K_2HPO_4 21,75 g

Hydrogénfosforečnan disodný dihydrát Na_2HPO_4. 2 H_20 33,40 g

Chlorid amónny, NH_4Cl 0,50 g

Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter. Hodnota pH roztoku musí byť 7,4.

b) Chlorid vápenatý bezvodý, $CaCl_2$ 27,50 g

alebo chlorid vápenatý dihydrát, $CaCl_2$, 2 H_20 36,40 g

Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter.

c) Síran horečnatý heptahydrát, $MgSO_4$. 7 H_2O 22,50 g

Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter.

d) Chlorid železitý hexahydrát, $FeCl_3$. $6H_2O$ 0,25 g

Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter.

Poznámka: Aby nebolo potrebné pripravovať tento roztok tesne pred jeho použitím, pridajte jednu kvapku koncentrovanej HC1 alebo 0,4 g EDTA na liter.

I.6.3. **Zásobné roztoky chemických látok a prípravkov**

Podľa vhodnosti napríklad rozpustite 1 až 10 g testovanej alebo referenčnej látky, alebo prípravku v deionizovanej vode a doplňte do 1 litra, ak rozpustnosť presahuje 1g/l. Inak pripravte zásobný roztok v minerálnom médiu alebo pridajte látku alebo prípravok priamo do minerálneho média. O zaobchádzaní s menej rozpustnými látkami alebo prípravkami pozri prílohu III, v teste MITI (metóda C.4-F) sa však nepoužívajú ani rozpúšťadlá, ani emulzifikátory.

▼B

I.6.4. **Inokulá**

Inokulum sa môže získať z rôznych zdrojov: napríklad z aktivovaného kalu, kanalizačného výtoku (bez chlóru), povrchových vôd, pôdy alebo ich zmesí. Ak sa používa aktivovaný kal pre testy DOC Die-Away, vývoj CO_2 a manometrická respirometria, odoberie sa z čističky alebo laboratórnej jednotky, ktoré spracúvajú najmä odpadové splaškové vody z domácností. Inokulá z iných zdrojov dávajú rozptýlenejšie výsledky. Zriedenejšie inokulum bez kalových vločiek je potrebné pre testy: modifikovaný skríningový OECD a test uzavretej fľaše, pričom uprednostňovaným zdrojom je sekundárny výtok z čističky odpadových vôd spracúvajúcej splaškové vody z domácností alebo laboratórna jednotka. Inokulum pre test MITI sa získava zo zmesi zdrojov a je opísané pod hlavičkou tohto špecifického testu.

I.6.4.1. *Inokulum z aktivovaných kalov*

Odoberie sa čerstvá vzorka aktivovaného kalu z prevzdušňovacieho tanku čističky odpadových vôd alebo laboratórnej jednotky, ktoré spracúvajú prevažne domáce splaškové vody. Odstránia sa hrubé častice, a ak je to nutné, použije sa jemné sitko a potom sa udržuje kal v aeróbnych podmienkach.

Alternatívne sa ponechá kal sedimentovať alebo sa odstredí (napr. 10 minút pri 1 100 g) po odstránení všetkých hrubých častíc. Odstráni sa supernatant. Kal sa môže premyť v minerálnom médiu. Suspenduje sa koncentrovaný kal v minerálnom médiu, aby sa získala koncentrácia tuhých častíc 3 až 5 g/l, a prevzdušňuje sa, pokiaľ je to potrebné.

Kal sa odoberie zo správne pracujúcej čističky. Ak sa musí kal odobrať z vysokostupňovej čističky alebo je možné, že obsahuje inhibitory, mal by sa premyť. Po dôkladnom premiešaní sa sedimentuje alebo odstredí resuspendovaný kal, odstráni sa supernatant a premytý kal znovu resuspenduje v ďalšom objeme minerálneho média. Tento postup sa opakuje, pokiaľ sa z kalu neodstráni nadbytok substrátu alebo inhibitor.

Z resuspendovaného alebo neošetreného kalu sa odoberie vzorka tesne pred použitím na stanovenie sušiny suspendovaných tuhých látok.

Ďalšou alternatívou je homogenizácia aktivovaného kalu (3 – 5 g suspendovaných tuhých látok/l). Kal sa prevzdušňuje v mechanickom mixéri 2 minúty pri strednej rýchlosti. Zmiešaný kal sa nechá sedimentovať 30 minút, alebo ak je to potrebné, aj dlhšie, a dekantuje sa kvapalinou na nižšie použitie ako inokulum v množstve 10 ml/-l minerálneho média.

I.6.4.2. *Ostatné zdroje inokula*

Inokulum sa môže získať zo sekundárneho výtoku čističky alebo laboratórnej jednotky spracúvajúcej prevažne domáce splaškové vody. Odoberie sa čerstvá vzorka a počas prepravy sa udržuje prevzdušňovaním. Nechá sa sedimentovať asi 1 hodinu alebo sa prefiltruje cez hrubý filtračný papier a udržuje sa kvapalina po odstránení sedimentu alebo filtrát v aeróbnom stave, pokiaľ je to potrebné. Tento typ inokula sa môže použiť až do objemu 100 ml na 1 liter minerálneho média.

▼B

Ďalším zdrojom inokula je povrchová voda. V tomto prípade sa odoberie vzorka z vhodnej povrchovej vody, napr. rieky, jazera a udržiava sa v aeróbnom stave. Ak je to potrebné, koncentruje sa inokulum filtráciou alebo odstredením.

I.6.5. **Aklimatizácia inokula**

Inokulum sa môže aklimatizovať na experimentálne podmienky, ale nie pred adaptované k testovanej látke alebo prípravku. Aklimatizácia pozostáva z prevzdušňovania aktivovaného kalu v minerálnom médiu alebo v sekundárnom výtoku počas 5 až 7 dní pri teplote testovania. Aklimatizácia niekedy zlepšuje presnosť skúšobných metód tým, že znižuje hodnoty slepých pokusov. Za nevyhnutné sa to považuje v prípade aklimatizácie inokula v rámci testu MITI.

I.6.6. **Abiotické kontroly**

Skontroluje sa možnosť abiotickej degradácie testovanej látky stanovením odstránenia DOC, spotreby kyslíka alebo vývoja oxidu uhličitého v sterilných kontrolách neobsahujúcich inokulum. Sterilizuje sa filtráciou cez membránu (0,2 až 0,45 mikrometra) alebo prídavkom vhodnej toxickej látky vo vhodnej koncentrácii. Ak sa použije membránová filtrácia, odoberie sa vzorka asepticky, aby sa udržala sterilita. Pokiaľ adsorpcia testovanej látky alebo prípravku to vopred nevylučuje, testy, ktoré merajú biodegradáciu ako odstránenie DOC, obzvlášť s inokulom z aktivovaného kalu, by mali zahŕňať abiotickú kontrolu, ktorá sa inokuluje a sterilizuje jedom.

I.6.7. **Počet baniek**

Počet baniek v typickom teste je uvedený pod hlavičkou každého testu.

Môžu sa použiť tieto typy baniek:

— Testovacia suspenzia: obsahujúca testovanú látku a inokulum.

— Inokulový slepý pokus: obsahujúci len inokulum.

— Kontrola postupu: obsahujúca referenčnú látku a inokulum.

— Abiotická sterilná kontrola: obsahujúca testovanú látku (pozri I.6.6).

— Kontrola adsorpcie: obsahujúca testovanú látku, inokulum a sterilizujúcu látku.

— Kontrola toxicity: obsahujúca testovanú látku, referenčnú látku a inokulum.

Stanovenie v skúšobnej suspenzii a inokulovom slepom pokuse sa vykoná paralelne. Odporúča sa tiež vykonať stanovenia aj v iných bankách paralelne.

Toto sa však nemôže vždy uskutočniť. Je potrebné zaistiť, aby sa odobrali dostatočné vzorky alebo vykonalo vhodné odčítanie, umožňujúce, aby sa zhodnotilo percentuálne odstránenie v 10-dňovom okne.

▼B

I.7. ÚDAJE A VYHODNOTENIE

Pri výpočte D_t, percentuálnej degradácie, sa použijú stredné hodnoty paralelných meraní parametrov v testovaných nádobách a v inokulovom slepom pokuse. Vzorce sú uvedené v častiach o špecifických testoch. Priebeh degradácie sa zobrazí graficky a vyznačí sa 10-dňové okno. Vypočíta sa a uvedie percentuálne odstránenie, ktoré sa dosiahlo na konci 10-dňového okna, a hodnota stacionárnej úrovne alebo na konci testu, podľa toho, čo je vhodné.

V respirometrických testoch látky obsahujúce dusík môžu ovplyvniť spotrebu kyslíka kvôli prebiehajúcej nitrifikácii (pozri prílohy II a V).

I.7.1. **Degradácia meraná pomocou stanovenia DOC**

Percentuálna degradácia D_t v každom čase, keď bola odobraná vzorka, by sa mala vypočítať oddelene pre banky obsahujúce testovanú látku použitím strednej hodnoty meraní DOC, aby sa mohla posúdiť platnosť testu (pozri I.5.2). To sa vypočíta na základe tejto rovnice:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{b0}}\right) \times 100$$

kde:

D_t = % degradácie v čase t;

C_o = stredná počiatočná koncentrácia DOC v inokulovanom kultivačnom médiu obsahujúcom testovanú látku (mg DOC/l);

C_t = stredná koncentrácia DOC v inokulovanom kultivačnom médiu obsahujúcom testovanú látku v čase t (mg DOC/l);

C_{bo} = stredná počiatočná koncentrácia DOC v slepom pokuse inokulovaného minerálneho média (mg DOC/l);

C_{bt} = stredná koncentrácia DOC v slepom pokuse inokulovaného minerálneho média v čase t (mg DOC/l).

Všetky koncentrácie sú namerané experimentálne.

I.7.2. **Degradácia meraná s použitím špeciálnych analýz**

Keď sú dostupné špecifické analytické údaje, primárna biodegradácia sa vypočíta z tejto z rovnice:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

kde:

D_t = percentuálna degradácia v čase t, normálne po 28 dňoch;

S_a = zvyškové množstvo testovanej látky v inokulovanom médiu na konci testu (mg);

S_b = zvyškové množstvo testovanej látky v slepom pokuse s vodou/médiom, ku ktorému sa pridala len testovaná látka (mg).

▼B

I.7.3. **Abiotická degradácia**

Ak sa použije abiotická sterilná kontrola, vypočíta sa percento abiotickej degradácie s použitím tejto rovnice:

$$\text{abiotická degradácia v \%} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

kde:

$C_{S(o)}$ = koncentrácia DOC v sterilnej kontrole, deň 0;

$C_{S(t)}$ = koncentrácia DOC v sterilnej kontrole, deň t.

I.8. SPRÁVA

Správa z testu by mala mať, ak je to možné, tieto informácie:

— testované a referenčné chemické látky a ich čistotu,

— podmienky skúšania,

— inokulum: povahu a miesto odobrania, koncentráciu a jeho predprípravu,

— pomer a povahu priemyselného odpadu prítomného v splaškových vodách, ak známa,

— dobu trvania testu a jeho teplotu,

— v prípade slabo rozpustných testovaných látok alebo prípravkov ich úpravu,

— aplikovanú testovaciu metódu, mali by byť uvedené vedecké dôvody a vysvetlenia pri akejkoľvek zmene postupu,

— súbor údajov,

— pozorované javy inhibície,

— každú pozorovanú abiotickú degradáciu,

— špecifické chemické analytické údaje, ak sú dostupné,

— analytické údaje o medziproduktoch, ak sú dostupné,

— graf závislosti percentuálnej degradácie oproti času pre testovanú a referenčnú látku, lag fázu, degradačnú fázu, 10-dňové okno a sklon by mali byť jasne uvedené (dodatok 1). Ak bol test v súlade s kritériami kvality, tak sa stredné hodnoty percentuálnej degradácie v bankách obsahujúcich testovanú látku môžu použiť na tvorbu grafu,

— percentuálne vyjadrenie odstránenia po 10-dňovom okne a v stacionárnej fáze alebo na konci testu.

ČASŤ II. **ÚBYTOK ROZPUSTENÉHO ORGANICKÉHO UHLÍKA (DOC DIE-AWAY)** (Metóda C.4-A)

II.1. PRINCÍP METÓDY

Známy objem inokulovaného minerálneho média so známou koncentráciou testovanej látky (10 až 40 mg DOC/1) ako nominálny jediný zdroj organického uhlíka sa prevzdušňuje za tmy alebo pri difúznom svetle pri teplote 22 ± 2 °C.

▼B

Degradácia sa sleduje pomocou analýzy DOC v častých intervaloch počas 28 dní. Stupeň biodegradácie sa vypočíta vyjadrením koncentrácie odstráneného DOC (upravené na kontrolu bez inokula) ako percento počiatočnej koncentrácie. Stupeň primárnej biodegradácie sa môže tiež vypočítať z dodatočnej analýzy na začiatku a na konci inkubácie.

II.2. OPIS METÓDY

II.2.1. **Prístroje**

a) Kónické banky, napr. 250 ml až 2 litre, v závislosti od potrebného objemu pre analýzu DOC.

b) Trepačka prispôsobená na kónické banky, a to s automatickým temperovaním teploty, alebo umiestnená v miestnosti so stabilnou teplotou a s dostatočným výkonom, aby zabezpečila aeróbne podmienky vo všetkých bankách.

c) Filtračné zariadenie s vhodnými membránami.

d) Analyzátor DOC.

e) Prístroj na stanovenie rozpusteného kyslíka.

f) Odstredivka.

II.2.2. **Príprava minerálneho média**

O príprave zásobných roztokov pozri I.6.2.

Zmieša sa 10 ml roztoku a) s 800 ml vody, pridá po 1 ml roztokov b) až d) a doplní do 1 litra vodou.

II.2.3. **Príprava a prekondiciovanie inokula**

Inokulum sa môže získať z rôznych zdrojov: aktivovaný kal, kanalizačný výtok, povrchové vody, pôda alebo ich zmesi.

Pozri: I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 a I.6.5.

II.2.4. **Príprava baniek**

Ako príklad sa do dvojlitrových kónických baniek s obsahom 800 ml minerálneho média pridajú vhodné objemy zásobných roztokov testovanej a referenčnej látky do oddelených baniek, aby sa získala koncentrácia ekvivalentná 10 až 40 mg DOC/l. Skontroluje sa pH hodnoty, a ak je to potrebné, upraví sa na hodnotu 7,4. Inokulujú sa banky s aktivovaným kalom alebo iným zdrojom inokula (pozri bod I.6.4), aby sa získala koncentrácia suspendovaných tuhých častíc menšia ako 30 mg/l. Pripravia sa tiež inokulové kontroly v minerálnom médiu, ale bez testovanej látky alebo referenčnej chemickej látky.

Ak je to potrebné, použite jednu nádobu na skontrolovanie možného inhibičného účinku testovanej látky alebo prípravku inokulovaním roztoku obsahujúceho v minerálnom médiu porovnateľné koncentrácie testovanej aj referenčnej chemickej látky.

Ak je to potrebné, použite tiež ďalšiu sterilnú banku, aby sa skontrolovalo, či sa testovaná látka alebo prípravok degraduje abioticky s použitím neinokulovaného roztoku chemickej látky (pozri I.6.6).

▼B

Okrem toho, ak existuje podozrenie, že sa testovaná látka alebo prípravok značne adsorbuje na sklo, kal atď., vykoná sa predbežné hodnotenie, aby sa stanovil pravdepodobný rozsah adsorpcie a tak aj vhodnosť testu pre látku alebo prípravok (pozri tabuľku 1). Pripraví sa banka obsahujúca testovanú látku, inokulum a sterilizačné činidlo.

Doplnia sa objemy vo všetkých bankách na 1 liter s minerálnym médiom a po premiešaní sa odoberie vzorka z každej banky na stanovenie počiatočnej koncentrácie DOC (pozri prílohu II.4). Otvory baniek sa prikryjú napr. hliníkovou fóliou takým spôsobom, aby sa umožnila voľná výmena vzduchu medzi bankou a okolitou atmosférou. Potom sa vložia nádoby do trepačky a vykoná sa test.

II.2.5. **Počet baniek v typickom teste**

Banky 1 a 2: Testovaná suspenzia.

Banky 3 a 4: Inokulový slepý pokus.

Banka 5: Kontrola postupu.

Odporúča sa, a ak je to potrebné:

Banka 6: Abiotická sterilná kontrola.

Banka 7: Kontrola na adsorpciu.

Banka 8: Kontrola toxicity.

Pozri tiež I.6.7.

II.2.6. **Realizácia testu**

Počas celého testu sa meria koncentrácia DOC v každej banke, v paralelkách, v známych časových intervaloch, dostatočne často, aby bolo možné stanoviť začiatok 10-dňového okna a percento odstránenia na konci 10-dňového okna. Odoberie sa len minimálny objem testovanej suspenzie, nevyhnutný na každé stanovenie.

Pred odberom vzorky sa doplnia straty vyparovaním z banky pridaním vody (I.6.1) v potrebnom množstve, ak je to nutné. Dôkladne sa premieša kultivačné médium pred odberom vzorky a zaistí sa, aby sa materiál, ktorý je prilepený k stenám nádob, rozpustil alebo suspendoval pred odobratím vzoriek. Po odobratí vzoriek sa ihneď filtrujú cez membránu alebo sa odstredia (pozri prílohu II.4). Filtrované alebo odstredené vzorky sa analyzujú v ten istý deň alebo sa skladujú pri teplote 2 – 4 °C maximálne 48 hodín alebo pod –18 °C dlhší čas.

II.3. ÚDAJE A SPRÁVA

II.3.1. **Spracovanie výsledkov**

Percento degradácie v čase t sa vypočíta tak, ako je uvedené v I.7.1 (stanovenie DOC) a prípadne podľa I.7.2 (špecifická analýza).

Všetky výsledky sa zaznamenajú na poskytnutý záznamník údajov.

▼B

II.3.2. **Platnosť výsledkov**

Pozri I.5.2.

II.3.3. **Správa**

Pozri I.8.

II.4. KARTA ÚDAJOV

Príklad karty údajov je uvedený nižšie.

TEST DOC DIE-AWAY

1. **LABORATÓRIUM**

2. **DÁTUM ZAČIATKU TESTU**

3. **TESTOVANÁ LÁTKA**

Názov:

Koncentrácia zásobného roztoku: ...mg/l chemickej látky.

Počiatočná koncentrácia v médiu: ...mg/l chemickej látky.

4. **INOKULUM**

Zdroj:

Vykonaná úprava:

Predkondiciovanie, ak sa vykonalo:

Koncentrácia suspendovaných tuhých látok v reakčnej zmesi: mg/l.

5. **STANOVENIE UHLÍKA**

Analyzátor uhlíka:

	Banka č.		DOC po n dňoch (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Testovaná látka a inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a, stredná hodnota $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, stredná hodnota $C_{b(t)}$					

▼B

	Banka č.		DOC po n dňoch (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Inokulový slepý pokus bez. testovanej chemickej látky	3	c_1					
		c_2					
		c, stredná hodnota $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d. stredná hodnota $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. VYHODNOTENIE ZÁKLADNÝCH ÚDAJOV

Banka č.		Degradáca v % po n dňoch				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Stredná hodnota ([1])	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

([1]) Z hodnôt D_1 a D_2 by sa nemal robiť priemer, ak je medzi nimi výrazný rozdiel.

Poznámka: Podobné tabuľky sa môžu použiť pre referenčnú látku alebo prípravok a kontroly toxicity.

7. ABIOTICKA KONTROLA (NEPOVINNÁ)

	Čas (dni)	
	0	t
Koncentrácia DOC (mg/l) v sterilnej kontrole	$C_{a(l)}$	$C_{a(t)}$

$$\text{abiotický rozklad v \%} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. ŠPECIÁLNA CHEMICKÁ ANALÝZA (NEPOVINNÁ)

	Zvyškové množstvo testovanej chemichej látky na konci testu (mg/l)	Primárna degradácia v %
Sterilná kontrola	S_b	

▼B

	Zvyškové množstvo testovanej chemickej látky na konci testu (mg/l)	Primárna degradácia v %
Inokulované skúšobné médium	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

ČASŤ III. **MODIFIKOVANÝ SKRÍNINGOVÝ TEST OECD** (METÓDA C.4-B)

III.1. PRINCÍP METÓDY

Odmeraný objem minerálneho média, obsahujúci známu koncentráciu testovanej látky (10 až 40 mg DOC/1), ako nominálny jediný zdroj organického uhlíka sa inokuluje s 0,5 ml odtoku z čistiarne odpadových vôd na liter média. Zmes sa prevzdušňuje v tme alebo pri difúznom osvetlení pri teplote 22 ± 2 °C.

Degradácia sa sleduje pomocou analýzy DOC v častých intervaloch počas 28 dní. Stupeň biodegradácie sa vypočíta vyjadrením koncentrácie odstráneného DOC (upravené na kontrolu bez inokula) ako percento počiatočnej koncentrácie. Stupeň primárnej biodegradácie sa môže tiež vypočítať z dodatočnej analýzy na začiatku a na konci inkubácie.

III.2. OPIS METÓDY

III.2.1. Prístroje

a) Kónické banky, napr. 250 ml až 2 litre, v závislosti od potrebného objemu pre analýzu DOC.

b) Trepačka prispôsobená na kónické banky, a to s automatickým temperovaním teploty alebo umiestnená v miestnosti so stabilnou teplotou a s dostatočným výkonom, aby zabezpečila aeróbne podmienky vo všetkých bankách.

c) Filtračné zariadenie s vhodnými membránami.

d) Analyzátor DOC.

e) Prístroj na stanovenie rozpusteného kyslíka.

f) Odstredivka.

III.2.2. **Príprava minerálneho média**

O príprave zásobných roztokov pozri I.6.2.

Zmieša sa 10 ml roztoku a) s 80 ml vody, pridá po 1 ml roztokov b) až d) a doplní sa do 1 litra vodou.

Táto metóda používa len 0,5 ml inokula na liter, a preto môže vzniknúť potreba fortifikácie média stopovými prvkami a rastovými faktormi. To sa dosiahne pridaním 1 ml z týchto roztokov na liter konečného média:

▼B

Roztok stopových prvkov:

Síran mangánatý tetrahydrát, $MnSO_4 . 4H_2O$	39,9 mg
Kyselina boritá, H_3BO_3	57,2 mg
Síran zinočnatý heptahydrát, $ZnSO_4 . 7H_2O$	42,8 mg
Heptamolybdenan hexaamónny, $(NH_4)_6 Mo_7O_{24}$	34,7 mg
Chelát Fe ($FeCl_3$ s kyselinou etyléndiamíntetraoctovou)	100,0 mg

Rozpustite vo vode a doplňte vodou na 1 liter.

Vitamínový roztok:

Kvasničný extrakt	15,0 mg

Kvasničný extrakt rozpustite v 100 ml vody. Sterilizujte filtráciou cez 0,2-mikrónovú (μm) membránu alebo pripravte čerstvý roztok.

III.2.3. **Príprava a prekondiciovanie inokula**

Inokulum sa môže získať zo sekundárneho výtoku čističky alebo laboratórnej jednotky, ktoré spracúvajú prevažne domáce splaškové vody. Pozri I.6.4.2 a I.6.5.

Použije sa 0,5 ml na liter minerálneho média.

III.2.4. **Príprava baniek**

Ako príklad pridajte 800 ml minerálneho média do 2-litrových kónických baniek a pridajte vhodné objemy zásobných roztokov testovanej a referenčnej látky do oddelených baniek, aby sa získala koncentrácia ekvivalentná 10 až 40 mg DOC/liter. Skontrolujte pH hodnoty, a ak je to potrebné, upravte ich na 7,4. Inokulujte banky s kanalizačným výtokom 0,5 ml/liter (pozri I.6.4.2). Tiež pripravte inokulové kontroly v minerálnom médiu, ale bez testovanej alebo referenčnej látky.

Ak je to potrebné, použite jednu nádobu na skontrolovanie možného inhibičného účinku testovanej látky alebo prípravku inokulovaním roztoku obsahujúceho v minerálnom médiu porovnateľné koncentrácie testovanej aj referenčnej chemickej látky.

Ak je to potrebné, použite tiež ďalšiu sterilnú banku, aby sa skontrolovalo, či sa testovaná látka alebo prípravok degraduje abioticky s použitím neinokulovaného roztoku chemickej látky (pozri I.6.6).

Okrem toho, ak existuje podozrenie, že sa testovaná látka alebo prípravok značne adsorbuje na sklo, kal atď., vykoná sa predbežné hodnotenie, aby sa stanovil pravdepodobný rozsah adsorpcie a tak aj vhodnosť testu pre látku alebo prípravok (pozri tabuľku 1). Pripraví sa banka obsahujúca testovanú látku, inokulum a sterilizačné činidlo.

Doplnia sa objemy vo všetkých bankách na 1 liter s minerálnym médiom a po premiešaní sa odoberie vzorka z každej banky na stanovenie počiatočnej koncentrácie DOC (pozri prílohu II.4). Otvory baniek sa prikryjú napr. hliníkovou fóliou takým spôsobom, aby sa umožnila voľná výmena vzduchu medzi bankou a okolitou atmosférou. Potom sa vložia nádoby do trepačky a vykoná sa test.

▼B

III.2.5. **Počet baniek v typickom teste**

Banky 1 a 2: Testovaná suspenzia.

Banky 3 a 4: Inokulový slepý pokus.

Banka 5: Kontrola postupu.

A odporúča sa, a ak je to potrebné:

Banka 6: Abiotická sterilná kontrola.

Banka 7: Kontrola na adsorpciu.

Banka 8: Kontrola toxicity.

Pozri tiež I.6.7.

III.2.6. **Realizácia testu**

Počas celého testu sa meria koncentrácia DOC v každej banke, v paralelkách, v známych časových intervaloch, dostatočne často, aby bolo možné stanoviť začiatok 10-dňového okna a percento odstránenia na konci 10-dňového okna. Odoberie sa len minimálny objem testovanej suspenzie, nevyhnutný na každé stanovenie.

Pred odberom vzorky sa doplnia straty vyparovaním z banky pridaním vody (I.6.1) v potrebnom množstve, ak je to nutné. Dôkladne sa premieša kultivačné médium pred odberom vzorky a zaistí sa, aby sa materiál, ktorý je prilepený k stenám nádob, rozpustil alebo suspendoval pred odobratím vzoriek. Po odobratí vzoriek sa ihneď filtrujú cez membránu alebo sa odstredia (pozri prílohu II.4). Filtrované alebo odstredené vzorky sa analyzujú v ten istý deň alebo sa skladujú pri teplote 2 – 4 °C maximálne 48 hodín alebo pod –18 °C dlhší čas.

III.3. ÚDAJE A SPRÁVA

III.3.1. **Spracovanie výsledkov**

Percento degradácie v čase t sa vypočíta tak, ako je uvedené v I.7.1 (stanovenie DOC) a prípadne podľa I.7.2 (špecifická analýza).

Všetky výsledky sa zaznamenajú na poskytnutý záznamník údajov.

III.3.2. Platnosť výsledkov

Pozri I.5.2.

III.3.3. Správa

Pozri I.8.

III.4. KARTA ÚDAJOV

Príklad karty údajov je uvedený nižšie.

MODIFIKOVANÝ SKRÍNINGOVÝ TEST OECD

1. **LABORATÓRIUM**

2. **DÁTUM ZAČIATKU TESTU**

▼B

3. **TESTOVANÁ LÁTKA**

Názov:

Koncentrácia zásobného roztoku: ...mg/l chemickej látky.

Počiatočná koncentrácia v médiu: ...mg/l chemickej látky

4. **INOKULUM**

Zdroj:

Vykonaná úprava:

Predkondiciovanie, ak sa vykonalo:

Koncentrácia suspendovaných tuhých látok v reakčnej zmesi: mg/l.

5. STANOVENIE UHLÍKA

Analyzátor uhlíka:

	Banka č.		DOC po n dňoch (mg/l[1])				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Testovaná látka a inokulum	1	a_1					
		a_2					
		a, stredná hodnota $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, stredná hodnota $C_{b(t)}$					
Inokulový slepý pokus bez. testovanej chemickej látky	3	c_1					
		c_2					
		c, stredná hodnota $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d. stredná hodnota $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. **VYHODNOTENIE ZÁKLADNÝCH ÚDAJOV**

Banka č.		Degradácia v % po n dňoch				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				

▼B

Banka č.		Degradácia v % po n dňoch				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(o)} - C_{bl(o)}}\right) \times 100$	0				
Stredná hodnota ([1])	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

([1]) Z hodnôt D_1 a D_2 by sa nemal robiť priemer, ak je medzi nimi výrazný rozdiel.

Poznámka: Podobné tabuľky sa môžu použiť pre referenčnú látku alebo prípravok a kontroly toxicity.

7. ABIOTICKÁ KONTROLA (NEPOVINNÁ)

	Čas (dni)	
	0	t
Koncentrácia DOC (mg/l) v sterilnej kontrole	$C_{a(i)}$	$C_{a(t)}$

$$\text{abiotický rozklad v \%} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. ŠPECIÁLNA CHEMICKÁ ANALÝZA (NEPOVINNÁ)

	Zvyškové množsatvo testovanej chemickej látky na konci testu (mg/l)	Prímárna degradácia v %
Sterilná kontrola	S_b	
Inokulované skúšobné médium	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

ČASŤ IV. VÝVOJ OXIDU UHLIČITÉHO (CO_2) (METÓDA C.4-C)

IV.1. PRINCÍP METÓDY

Odmeraný objem inokulovaného minerálneho média, obsahujúceho známu koncentráciu testovanej látky alebo prípravku (10 až 20 mg DOC alebo TOC/l) ako nominálneho jediného zdroja organického uhlíka sa prevzdušňuje prechodom vzduchu neobsahujúceho CO_2 v kontrolovaných podmienkach za tmy alebo pri difúznom osvetlení. Degradácia sa meria počas 28 dní stanovovaním uvoľňovaného CO_2, ktorý sa zachytáva v hydroxide bárnatom alebo hydroxide sodnom a ktorý sa meria titráciou zvyškového hydroxidu alebo ako anorganický uhlík. Množstvo produkovaného CO_2 z testovanej látky alebo prípravku (upravené na hodnotu slepého inokulového pokusu) sa vyjadrí ako percento $ThCO_2$. Stupeň biodegradácie sa môže tiež vypočítať z dodatočnej analýzy DOC vykonanej na začiatku a na konci inkubácie.

▼B

IV.2. OPIS METÓDY

IV.2.1. **Prístroje**

a) 2-až 5-litrové banky, vybavené s aeračnou trubicou, dosahujúcou takmer na dno nádoby a výstupnou trubicou;

b) magnetické miešadlá, keď sa hodnotia slabo rozpustné látky alebo prípravky;

c) fľaše na absorbovanie plynu;

d) zariadenie na kontrolu a meranie prietoku vzduchu;

e) prístroj na odstránenie CO_2 pri príprave vzduchu, ktorý neobsahuje CO_2; prípadne sa môže použiť zmes kyslíka neobsahujúceho CO_2 a dusíka neobsahujúceho CO_2 z plynových fliaš v správnom pomere (20 % O_2 : 80 % N_2);

f) zariadenie na stanovenie CO_2, a to buď titráciou, alebo nejakým analyzátorom anorganického uhlíka;

g) zariadenie na membránovú filtráciu (nepovinné);

h) analyzátor DOC (nepovinné).

IV.2.2. **Príprava minerálneho média**

O príprave zásobných roztokov pozri I.6.2.

Zmiešajte 10 ml roztoku a) s 800 ml vody, pridajte po 1 ml roztokov b) až d) a doplňte vodou do 1 litra.

IV.2.3. **Príprava a prekondiciovanie inokula**

Inokulum sa môže získať z rôznych zdrojov: aktivovaný kal, kanalizačný výtok, povrchové vody, pôda alebo ich zmesi.

Pozri I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 a I.6.5.

IV.2.4. **Príprava baniek**

Ako príklad sa uvádzajú nasledujúce objemy a hmotnosti pre 5-litrové banky obsahujúce 3 litre suspenzie. Ak sa použijú menšie objemy, tieto hodnoty je potrebné podľa nich upraviť, ale je potrebné zaistiť, aby bolo možné presne merať vytváraný oxid uhličitý.

Do každej 5-litrovej banky pridajte 2 400 ml minerálneho média. Pridajte vhodný objem pripraveného aktivovaného kalu (pozri I.6.4.1 a I.6.5) tak, aby získaná koncentrácia suspendovaných tuhých častíc nepresiahla 30 mg/l v konečnej 3-litrovej inokulovanej zmesi. Alternatívne najskôr zrieďte pripravený kal v minerálnom médiu na suspenziu s koncentráciou 500 až 1 000 mg/l pred pridaním daného objemu do 5-litrovej banky tak, aby sa získala koncentrácia 30 mg/l; to zaistí väčšiu presnosť. Môžu použiť aj iné zdroje inokula (pozri I.6.4.2).

Cez noc prevzdušňujte tieto inokulované zmesi so vzduchom, ktorý neobsahuje CO_2, aby sa odstránil CO_2 zo systému.

▼B

Oddelene pridajte testovaný materiál a referenčnú látku v známom objeme zásobných roztokov, použite paralelky v koncentráciách za prídavku látky alebo prípravku 10 až 20 mg DOC alebo TOC/-l, nechajte niektoré banky bez prídavku látky alebo prípravku ako inokulové kontroly. Slabo rozpustné testované látky pridajte priamo do baniek v takom množstve alebo objeme, ako je uvedené v dodatku 3.

Ak je to potrebné, použite jednu banku na kontrolu inhibičného účinku testovanej látky alebo prípravku pridaním testovanej aj referenčnej látky alebo prípravku v tej istej koncentrácii, aká je v ostatných bankách.

Takisto, ak je to potrebné, použite ďalšiu sterilnú banku na kontrolu, či sa testovaná látka alebo prípravok degraduje abioticky s použitím neinokulovaného roztoku látky alebo prípravku (pozri I.6.6). Sterilizujte prídavkom jedovatej látky vo vhodnej koncentrácii.

Doplňte objemy suspenzií vo všetkých bankách na 3 litre pridaním minerálneho média, ktoré sa predtým prevzdušnilo vzduchom neobsahujúcim CO_2. Prípadne sa môžu odobrať vzorky na analýzu DOC (pozri prílohu II.4) a/alebo na špecifickú analýzu. Pripojte absorpčné fľaše na výstupy z baniek.

Ak sa použije hydroxid bárnatý, sériovo spojte tri absorpčné fľaše, každú obsahujúcu 100 ml 0,0125 M roztoku hydroxidu bárnatého ku každej 5-litrovej banke. Roztoky nesmú obsahovať zrazeniny síranov a uhličitanov a ich sila sa musí stanoviť tesne pred použitím. Ak sa použije hydroxid sodný, pripojte dve fľaše, z ktorých druhá bude určená na demonštráciu, že sa všetok CO_2 absorboval v prvej fľaši. Absorpčné fľaše, na ktoré sedia uzávery sérových fliaš, sú bežne dostupné. Pridajte 200 ml 0,05 M NaOH do každej fľaše, čo stačí na absorbovanie všetkého CO_2, ktorý sa môže vyvinúť pri úplnej degradácii testovanej látky. Roztok NaOH, aj keď je čerstvo pripravený, bude obsahovať stopy uhličitanov; to sa koriguje stanovením uhličitanu v slepom pokuse.

IV.2.5. **Počet baniek v typickom teste**

Banky 1 a 2: Testovaná suspenzia,.

Banky 3 a 4: Inokulový slepý pokus.

Banka 5: Kontrola postupu.

A odporúča sa, a ak je to potrebné:

Banka 6: Abiotická sterilná kontrola.

Banka 7: Kontrola toxicity.

Pozri tiež I.6.7.

IV.2.6. **Realizácia testu**

Začnite test prebublávaním vzduchu bez CO_2 cez suspenziu pri prietoku 30 až 100 ml/min. Periodicky odoberajte vzorky absorbenta CO_2 na analýzu obsahu CO_2. Odporúča sa počas prvých desiatich dní vykonávať analýzy každý druhý alebo tretí deň a potom každý piaty deň až do 28. dňa, takže sa obdobie 10-dňového okna môže identifikovať.

▼B

Na 28. deň odoberte vzorky (voliteľné) na stanovenie DOC a/alebo špecifickú analýzu, merajte pH suspenzie a pridajte 1 ml koncentrovanej HCl do každej banky, prevzdušnite banky cez noc, aby sa odstránil CO_2 prítomný v testovaných suspenziách. Na 29. deň vykonajte posledné analýzy uvoľneného CO_2.

V dňoch merania CO_2 odpojte najbližšiu fľašu s $Ba(OH)_2$ k banke a titrujte roztok hydroxidu s 0,05 M HCl s použitím fenolftaleínu ako indikátora. Posuňte zostávajúce fľaše bližšie k banke a pripojte novú fľašu s absorbentom obsahujúcu 100 ml čerstvého roztoku 0,0125 M $Ba(OH)_2$ na koniec série fliaš. Vykonajte titrácie, ak sú potrebné, napr. keď sú zrazeniny viditeľné v prvej fľaši, ale predtým ako sú viditeľné v druhej fľaši alebo aspoň raz za týždeň. Ďalšou možnosťou je použitie NaOH ako absorbenta, v tomto prípade (v závislosti od charakteristiky použitého analyzátora uhlíka) odoberte striekačkou malú vzorku roztoku NaOH z absorpčnej fľaše bližšej k banke. Injektujte vzorku do časti IC analyzátora uhlíka na priamu analýzu uvoľneného CO_2.

Analyzujte obsah druhej záchytnej fľaše len na konci testu, aby sa korigovala hodnota na prípadne prenesený CO_2.

IV.3. ÚDAJE A SPRÁVA

IV.3.1. **Spracovanie výsledkov**

Množstvo zachyteného CO_2 v absorbente sa pri titrácii určuje podľa rovnice:

$$mgCO_2 = (100 \times C_B - 0{,}5 \times V \times C_A) \times 44$$

kde:

V = objem HCl použitý na titráciu 100 ml absorbenta (ml);

C_B = koncentrácia roztoku $Ba(OH)_2$ (M);

C_A = koncentrácia roztoku HCl (M);

ak je C_B 0,0125 M a C_A je 0,05 M, titrácia 100 ml $Ba(OH)_2$ je 50 ml a hmotnosť CO_2 je daná podľa rovnice:

$$\frac{0{,}05}{2} \times 44 \times \text{ml HCl titrované} = 1{,}1 \times \text{ml HCl}$$

Preto sa v takomto prípade konvertuje objem titrovanej HCl na vytvorený CO_2 v mg faktorom 1,1.

Vypočítajte hmotnosti vytvoreného CO_2 samotným inokulom a inokulom v prítomnosti testovanej látky alebo prípravku s použitím príslušných hodnôt titrácií, potom rozdiel je hmotnosť vytvoreného CO_2 zo samotnej testovanej látky alebo prípravku.

Napríklad ak samotné inokulum má spotrebu na titráciu 48 ml a inokulum v prítomnosti testovanej látky má spotrebu 45 ml,

$$CO_2 \text{ z inokula} = 1{,}1 \times (50 - 48) = 2{,}2 \text{ mg}$$

▼B

CO_2 z inokula v prítomnosti testovanej látky = 1,1 × (50 – 45) = 5,5 mg,

a preto hmotnosť vytvoreného CO_2 z testovanej látky alebo prípravku je 3,3 mg.

Percento biodegradácie sa vypočíta z rovnice:

$$\% \text{ degradácie} = \frac{\text{mg vytvoreného } CO_2 \times 100}{ThCO_2 \times \text{mg pridanej testovanej látky alebo prípravku}}$$

alebo

$$\% \text{ degradácie} = \frac{\text{mg vytvoreného } CO_2 \times 100}{\text{mg pridaného TOC v teste} \times 3,67}$$

kde 3,67 je konverzný faktor (44/12) pre uhlík na oxid uhličitý.

Získajte percentuálnu degradáciu po každom časovom intervale pridaním percenta z vypočítaných hodnôt $ThCO_2$ pre každý deň až do času, keď sa merala.

Pre absorbent NaOH vypočítajte množstvo uvoľneného CO_2, vyjadrené ako IC (mg), vynásobením koncentrácie IC v absorbente objemom absorbentu.

Percento degradácie sa vypočíta podľa rovnice:

$$\% ThCO_2 = \frac{\text{mg IC z testovanej banky} - \text{mg IC zo slepého pokusu}}{\text{mg TOC pridané ako testovaná látka alebo prípravok}} \times 100$$

Odstránenie DOC (nepovinné) sa vypočíta podľa I.7. Zaznamenajte tieto a ostatné výsledky do uvedenej karty údajov.

IV.3.2. **Platnosť výsledkov**

Obsah IC v suspenzii testovanej látky alebo prípravku v minerálnom médiu na začiatku testu musí byť menší ako 5 % TC a celková tvorba CO_2 v inokulovom slepom pokuse na konci testu by nemala normálne presahovať 40 mg/l média. Ak sú hodnoty väčšie ako 70 mg CO_2/liter, potom by sa mali kriticky posúdiť údaje aj experimentálna technika.

Pozri tiež I.5.2.

IV.3.3. **Správa**

Pozri I.8.

IV.4. KARTA ÚDAJOV

Príklad záznamníka údajov je uvedený nižšie.

TEST VÝVOJA OXIDU UHLIČITÉHO

1. **LABORATÓRIUM**

2. **DÁTUM ZAČIATKU TESTU**

3. **TESTOVANÁ LÁTKA ALEBO PRÍPRAVOK**

Názov:

Koncentrácia zásobného roztoku: …mg/liter chemickej látky

▼B

Počiatočná koncentrácia v médiu: …mg/liter chemickej látky

Celkový C pridaný do banky: …mg C,

$ThCO_2$: mg CO_2

4. **INOKULUM**

Zdroj:

Úprava:

Prekondiciovanie, ak sa vykonalo:

Koncentrácia suspendovaných tuhých látok v reakčnej zmesi: mg/liter.

5. TVORBA OXIDU UHLIČITÉHO A DEGRADOVATEĽNOSŤ

Metóda: $Ba(OH)_{2/NaOH/iné}$

Čas (dni)	CO_2 vytvorený v teste (mg)		CO_2 veidošanās no tukša parauga (mg)		Celkové množstvo CO_2 (priemer v teste mínus priemer v teste naslepo) (mg)		% $THCO_2$ celkový $\frac{CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 / 2	priemer	3 / 4	priemer	1	2	1	2	priemer
0									
n_1									
n_2									
n_3									
28									

Poznámka: podobné tabuľky sa môžu použiť pre referenčné chemické látky a na kontrolu toxicity.

6. **ANALÝZA UHLÍKA (NEPOVINNÁ)**

Analyzátor uhlíka:

Čas (dni)	Test naslepo (mg/l)	Testovaná látka (mg/l)
0	$C_{b(l)}$	C_0
28 ([1])	$C_{b(t)}$	C_t

([1]) alebo na konci kultivácie.

▼B

$$\% \text{ odstráneného DOC} = \left(1 - \frac{C_t - C_{b(t)}}{C_t - C_{b(o)}}\right) \times 100$$

7. **ABIOTICKÁ DEGRADÁCIA (NEPOVINNÉ)**

$$\% \text{ abiotickej degradácie} = \frac{CO_2 - \text{tvorba CO2 v sterílnej banke po 28 dňoch (mg)}}{ThCO_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

ČASŤ V. **TEST MANOMETRICKEJ RESPIROMETRIE** (METÓDA C.4-D)

V.1. PRINCÍP METÓDY

Známy objem inokulovaného minerálneho média, obsahujúci známu koncentráciu testovanej látky alebo prípravku (100 mg/liter testovanej látky, aby sa dosiahla koncentrácia aspoň 50 až 100 mg ThOD/liter) ako jediného nominálneho zdroja organického uhlíka, sa mieša v uzavretej banke pri konštantnej teplote (± 1 °C alebo presnejšie) počas 28 dní. Spotreba kyslíka sa stanoví meraním množstva kyslíka (produkovaného elektrolyticky), ktoré vyžaduje udržiavanie konštantného objemu plynu v respirometrickej banke, alebo zo zmien v objeme alebo tlaku (alebo ich kombinácia) v prístroji. Vyvinutý oxid uhličitý sa absorbuje v roztoku KOH alebo iného vhodného absorbenta. Množstvo kyslíka odobraného testovanou látkou alebo prípravkom (upravené na spotrebu inokulového slepého pokusu, ktorý prebieha paralelne) sa vyjadrí ako percento z ThOD alebo CHSK. Primárna biodegradácia sa môže prípadne tiež vypočítať z dodatočnej špecifickej analýzy vykonanej na začiatku a na konci inkubácie a z úplnej biodegradácie na základe analýzy DOC.

V.2. OPIS METÓDY

V.2.1. **Prístroje**

a) vhodný respirometer;

b) prístroj na udržiavanie a kontrolu teploty (± 1 °C alebo presnejšie);

c) zostava pre membránovú filtráciu (nepovinné);

d) analyzátor uhlíka (nepovinné).

V.2.2. **Príprava minerálneho média**

O príprave zásobných roztokov pozri I.6.2.

Zmiešajte 10 ml roztoku a) s 800 ml vody, pridajte po 1 ml roztokov b) až d) a doplňte vodou do 1 litra.

V.2.3. **Príprava a prekondiciovanie inokula**

Inokulum sa môže získať z rôznych zdrojov: aktivovaného kalu, kanalizačného výtoku, povrchových vôd, pôdy alebo ich zmesí.

Pozri I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 a I.6.5.

V.2.4. **Príprava baniek**

S použitím zásobných roztokov pripravte v oddelených sadách 100 mg roztoky testovanej látky alebo prípravku a referenčnej látky/liter (ktoré poskytujú aspoň 50 až 100 mg ThOD/liter).

▼B

Vypočítajte ThOD na základe tvorby amónnych solí, pokiaľ nedochádza k nitrifikácii, keď by výpočet mal byť založený na tvorbe dusičnanov (pozri prílohu II.2).

Stanovte hodnoty pH, a ak je to potrebné, upravte ich na 7,4 ± 0,2.

Slabo rozpustné látky alebo prípravky by sa mali pridať neskôr (pozri nižšie).

Ak sa má stanoviť toxicita testovanej látky alebo prípravku, pripravte roztok v minerálnom médiu, ktorý obsahuje súčasne testovanú látku alebo prípravok aj referenčnú látku v tých istých koncentráciách ako v jednotlivých roztokoch.

Ak sa vyžaduje meranie fyzikálno-chemickej spotreby kyslíka, pripravte roztok testovanej látky alebo prípravku, normálne 100 mg ThOD/liter, ktorý bol sterilizovaný prídavkom vhodnej toxickej látky (pozri I.6.6).

Umiestnite pripravené objemy roztokov testovanej a referenčnej látky alebo prípravku aspoň do dvoch paralelných baniek. Do ďalších baniek pridajte len minerálne médium (na inokulové kontroly), a ak sa to vyžaduje, zmes roztoku testovanej a referenčnej látky alebo prípravku a sterilného roztoku.

Ak je testovaná chemická látka slabo rozpustná, pridajte ju priamo na hmotnostnom alebo objemovom základe alebo postupujte podľa prílohy III. Pridajte KOH pelety alebo iný absorbent do častí určených na absorbciu CO_2.

V.2.5. **Počet baniek v typickom teste**

Banky 1 a 2: Testovaná suspenzia

Banky 3 a 4: Inokulový slepý pokus

Banka 5: Kontrola postupu

A odporúča sa, ak je to potrebné:

Banka 6: Sterilná kontrola

Banka 7: Kontrola toxicity

Pozri tiež I.6.7.

V.2.6. **Realizácia testu**

Zohrejte nádoby na požadovanú teplotu a inokulujte ich s pripraveným aktivovaným kalom alebo iným zdrojom inokula tak, aby koncentrácia suspendovaných tuhých častíc nepresiahla 30 mg/liter. Zložte zariadenie, zapnite miešadlo, skontrolujte vzduchotesnosť a začnite meranie spotreby kyslíka. Zvyčajne nie je potrebná iná starostlivosť, ako získať potrebné údaje a vykonať dennú kontrolu správnosti teploty a miešania.

Vypočítajte spotrebu kyslíka z údajov, ktoré sa zistili v pravidelných a častých intervaloch, podľa metód uvedených výrobcom zariadenia. Na konci inkubácie, normálne po 28 dňoch, odmerajte pH obsahu baniek, najmä ak spotreba kyslíka bola nízka alebo väčšia ako $ThODNH_4$ (pre chemické látky obsahujúce dusík).

▼B

Ak je to potrebné, odoberte vzorky z respirometrických baniek na začiatku a na konci na analýzu DOC alebo špecifickej látky alebo prípravku (pozri prílohu II.4). Pri počiatočnom odbere zaistite, aby zostávajúci objem testovanej suspenzie v banke bol známy. Ak sa kyslík spotrebúva testovanou látkou obsahujúcou dusík, stanovte nárast koncentrácie dusitanov a dusičnanov počas 28 dní a vypočítajte korekciu na kyslík spotrebovaný nitrifikáciou (dodatok 5).

V.3. ÚDAJE A SPRÁVA

V.3.1. **Spracovanie výsledkov**

Vydeľte spotrebu kyslíka (mg) testovanou látkou alebo prípravkom po danom čase (upravené na spotrebu kyslíka kontrolným inokulovým slepým pokusom po rovnakom čase) hmotnosťou použitej testovanej látky alebo prípravku. Tak sa získa BSK, vyjadrená ako mg kyslíka/mg testovanej látky alebo prípravku, t. j.:

$$\text{BOD} = \frac{(\text{mg spotreby } O_2 \text{testovanej látky} - \text{mg spotreby } O_2 \text{ slepého pokusu})}{(\text{mg testovanej látky alebo prípravku v banke})}$$

= mg O_2 na mg testovanej látky alebo prípravku

Vypočítajte percento biodegradácie buď z rovnice:

$$\%\ \text{biodegradácie} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg BSK}(\text{mg O2 látky alebo prípravku}))}{\text{ThOD}(\text{mg } O_2/\text{mg ThOD}(\text{mg O2 látky alebo prípravku}))} \times 100$$

alebo z rovnice

$$\%\ \text{COD} = \frac{\text{BOD}(\text{mg } O_2/\text{mg BSK}(\text{mg O2 látky alebo prípravku}))}{\text{ThOD}(\text{mg } O_2/\text{mg ThOD}(\text{mg O2 látky alebo prípravku}))} \times 100$$

Je potrebné poznamenať, že tieto dve metódy nemusia nutne poskytovať rovnakú hodnotu, uprednostňuje sa použitie prvej metódy.

Pre testované látky alebo prípravky obsahujúce dusík použite vhodné ThOD (NH_4 alebo NO_3) podľa toho, čo je známe alebo sa očakáva o výskyte nitrifikácie (pozri prílohu II.2). Ak dôjde k výskytu nitrifikácie, ale nie úplnej, vypočítajte úpravu na kyslík spotrebovaný nitrifikáciou zo zmien v koncentrácii dusitanov a dusičnanov (dodatok 5).

Ak sú vykonané voliteľné stanovenia organického uhlíka a/alebo špecifickej látky alebo prípravku, vypočítajte percento degradácie podľa I.7 tejto metodiky.

Zaznamenajte všetky výsledky na pripojený záznamník údajov.

V.3.2. **Platnosť výsledkov**

Spotreba kyslíka v inokulovom slepom pokuse je normálne 20 až 30 mg O_2 na liter a nemala by presahovať 60 mg/liter za 28 dní. Hodnoty vyššie ako 60 mg/liter vyžadujú kritické prehodnotenie údajov a experimentálnych techník. Ak pH hodnota je mimo rozsahu 6 až 8,5 a spotreba kyslíka testovanou látkou alebo prípravkom je menšia ako 60 %, potom by sa mal test zopakovať s nižšou koncentráciou testovanej látky.

Pozri tiež I.5.2.

▼B

V.3.3. **Správa**

Pozri I.8.

V.4. **KARTA ÚDAJOV**

Príklad záznamníka údajov je uvedený ďalej.

TEST MANOMETRICKEJ RESPIROMETRIE

1. **LABORATÓRIUM**

2. **DÁTUM ZAČIATKU TESTU**

3. **TESTOVANÁ LÁTKA ALEBO PRÍPRAVOK**

Názov:

Koncentrácia zásobného roztoku: … mg/liter

Počiatočná koncentrácia v médiu, C_o: … mg/liter

Objem v skúšobnej banke (V): … ml

ThOD alebo CHSK: mg O_2/mg testovanej látky (NH_4 alebo NO_3)

4. **INOKULUM**

Zdroj:

Úprava:

Prekondiciovanie, ak sa vykonalo:

Koncentrácia suspendovaných tuhých látok v reakčnej zmesi: mg/liter.

5. **SPOTREBA KYSLÍKA: BIODEGRADOVATEĽNOSŤ**

		Čas (dni)											
		0		7		14			21			28	
Spotreba O_2 (mg) testovanou látkou	1												
	2												
	a, priemer												
Spotreba O_2 (mg) v teste naslepo	3												
	4												
	b, priemer												
Korigovaná BSK (mg)	$(a_1 - b_m)$												
	$(a_2 - b_m)$												
BSK na mg testovanej látky	$\frac{(a_1 - b)}{C_o V}$												
	$\frac{(a_2 - b)}{C_o V}$												

▼B

		Čas (dni)											
		0		7		14			21			28	
Rozklad v % $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$	D_1 (a_1)												
	D_2 (a_2)												
	Priemer (*)												

V = objem média v skúšobnej banke.
(*) Nemal by sa urobiť priemer z hodnôt D_1 a D_2, ak je medzi nimi výrazný rozdiel.

Poznámka: Podobná tabuľka sa môže použiť pre referenčnú chemickú látku a na kontrolu toxicity.

6. **KOREKCIA NA NITRIFIKÁCIU (POZRI PRÍLOHU V).**

Deň		0	28	Rozdiel
i)	Koncentrácia dusičnanov (mg N na liter)			{N}
ii)	Kyslíkový ekvivalent (4,57 × N × V) (mg)	—	—	
iii)	Koncentrácia dusitanov (mg N na liter)			{N}
iv)	Kyslíkový ekvivalent (3,43 × N × V) (mg)	—	—	
ii + iv)	Celkový kyslíkový ekvivalent	—	—	

7. **ANALÝZA UHLÍKA (NEPOVINNÉ)**

Analyzátor uhlíka:

Čas (dni)	Test naslepo (mg/l)	Testovaná látka (mg/l)
D	(C_{blo})	(C_o)
28 (*)	(C_{blt})	(C_t)

(*) Alebo na konci inkubácie.

$$\% \text{ DOC \% odstráneného} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}}\right) \times 100$$

8. **ŠPECIFICKÁ CHEMICKÁ LÁTKA (NEPOVINNÉ)**

S_b = koncentrácia vo fyzikálno-chemickej (sterilnej) kontrole po 28 dňoch

S_a = koncentrácia v inokulovanej banke po 28 dňoch.

$$\% \text{ biodegradácie} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. **ABIOTICKÁ DEGRADÁCIA (NEPOVINNÉ)**

a = spotreba kyslíka (O_2) v sterilných bankách po 28 dňoch (mg)

$$\text{spotreba kyslíka na mg testovavej látky alebo prípravku} = \frac{a}{C_o V}$$

▼B

(pozri oddiely 1 a 3)

$$\% \text{ abiotickej degradácie } = \frac{a \times 100}{C_o V \times ThOD}$$

ČASŤ VI. **TEST UZAVRETEJ FĽAŠE** (METÓDA C.4-E)

VI.1. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Roztok testovanej látky alebo prípravku v minerálnom médiu, 2 až 5 mg/liter, sa inokuluje s relatívne malým počtom mikroorganizmov zo zmesovej populácie a udržiava sa v úplne plných, uzavretých fľašiach v tme za konštantnej teploty. Degradácia sa sleduje analýzou rozpusteného kyslíka počas 28-dňového obdobia. Množstvo spotrebovaného kyslíka testovanou látkou alebo prípravkom, upravené na spotrebu inokulového slepého pokusu, ktorý sa testuje paralelne, sa vyjadrí ako percento ThOD alebo CHSK.

VI.2. OPIS METÓDY

VI.2.1. **Prístroje**

a) fľaše BSK so sklenenými uzávermi, napr. 250 až 300 ml;

b) vodný kúpeľ alebo inkubátor na udržiavanie fliaš pri konštantnej teplote (± 1 °C alebo presnejšie) s vylúčením svetla;

c) veľké sklenené fľaše (2-až 5-litrové) na prípravu média na naplnenie fliaš BSK;

d) kyslíková elektróda a prístroj alebo zariadenie a reagenty na Winklerovu titráciu.

VI.2.2. **Príprava minerálneho média**

O príprave zásobných roztokov pozri I.6.2.

Zmiešajte 1 (jeden) ml roztokov (a) až (d) a doplňte vodou do 1 litra.

VI.2.3. **Príprava inokula**

Inokulum sa normálne získa zo sekundárneho výtoku čističky alebo laboratórnej jednotky, ktoré prevažne spracúvajú domáce splaškové vody. Alternatívnym zdrojom inokula je povrchová voda. Používa sa jedna kvapka (0,05 ml) až 5 ml filtrátu na liter média, môžu byť potrebné pokusy na zistenie optimálneho objemu pre daný výtok (pozri I.6.4.2 a I.6.5).

VI.2.4. **Príprava baniek**

Aspoň 20 minút intenzívne prevzdušňujte minerálne médium. Pripravte každú testovaciu sériu z minerálneho média z tej istej zásoby. Vo všeobecnosti je médium pripravené na použitie až po 20 hodinách státia pri teplote testovania. Stanovte koncentráciu rozpusteného kyslíka na účely kontroly, pri 20 °C by mala byť hodnota okolo 9 mg/liter. Vykonajte všetky prenosy a plnenia vzduchom nasýteného, bubliny neobsahujúceho média, napr. s použitím sifónu.

▼B

Pripravte paralelné skupiny BSK fliaš na stanovenie testovanej a referenčnej látky na simultánne experimentálne série. Zostavte dostatočný počet BSK fliaš vrátane inokulového slepého pokusu, tak aby bolo možné meranie spotreby kyslíka aspoň v dvoch paralelkách v požadovaných skúšobných intervaloch, napr. po 0, 7, 14, 21 a 28 dňoch. Viac fliaš sa môže vyžadovať na zaistenie identifikácie 10-dňového okna.

Pridajte kompletne prevzdušnené minerálne médium do veľkých fliaš tak, aby boli naplnené asi do jednej tretiny. Potom pridajte vhodné množstvo zásobných roztokov testovanej látky alebo prípravku a referenčnej látky do osobitných veľkých fliaš tak, aby konečná koncentrácia látky alebo prípravku nepresahovala 10 mg/liter. Do ďalšej veľkej fľaše obsahujúcej kontrolný slepý pokus nepridávajte žiadne látky ani prípravky.

Aby sa zaistilo, že aktivita inokula nie je limitovaná, koncentrácia rozpusteného kyslíka nesmie byť v BSK fľašiach nižšia ako 0,5 mg/liter. To limituje koncentráciu testovanej látky alebo prípravku asi na 2 mg/liter. Avšak v prípade slabo degradovateľných látok alebo prípravkov a látok alebo prípravkov s nízkou hodnotou ThOD sa môže použiť koncentrácia 5 až 10 mg/liter. V niektorých prípadoch sa odporúča testovať paralelne pri dvoch rozdielnych koncentráciách, napríklad 2 mg/liter a 5 mg/liter. Normálnym spôsobom vypočítajte ThOD na základe tvorby amónnych solí, ale ak sa vie alebo očakáva, že bude prebiehať nitrifikácia, je potrebné vypočítať túto hodnotu na základe tvorby dusičnanov ($ThOD_{NO3}$: pozri prílohu II.2). Ak však nitrifikácia nie je úplná, ale predsa prebieha, je potrebné vykonať korekciu na zmeny v koncentrácii dusitanov a dusičnanov stanovených analýzou (pozri prílohu V).

Ak je potrebné testovať toxicitu testovanej látky alebo prípravku (v prípade napríklad zistenej nízkej biodegradovateľnosti), sú potrebné ďalšie série fliaš.

Pripravte ďalšiu veľkú fľašu obsahujúcu prevzdušnené minerálne médium (asi do jednej tretiny jej objemu) a testovanú látku alebo prípravok a referenčnú látku v rovnakých konečných koncentráciách, aké sú v ostatných veľkých fľašiach.

Inokulujte roztoky vo veľkých fľašiach so sekundárnym výtokom (jedna kvapka alebo asi 0,05 ml až 5 ml/liter) alebo iným zdrojom, ako je riečna voda (pozri I.6.4.2). Nakoniec doplňte roztoky na objem s prevzdušneným minerálnym médiom s použitím hadičky dosahujúcej až na dno fľaše, aby sa dosiahlo riadne premiešanie.

VI.2.5. **Počet baniek v typickom teste**

V typickom teste sa použijú tieto fľaše:

— aspoň 10 fliaš obsahujúcich testovanú látku alebo prípravok a inokulum (testovaná suspenzia),

— aspoň 10 fliaš obsahujúcich len inokulum (inokulový slepý pokus),

— aspoň 10 fliaš obsahujúcich referenčnú látku a inokulum (kontrola postupu),

▼B

— a ak je to nutné, 6 fliaš obsahujúcich testovanú látku alebo prípravok, referenčnú látku a inokulum (kontrola toxicity). Aby sa však zaistila identifikácia 10-dňového okna, bol by potrebný približne dvojnásobný počet fliaš.

VI.2.6. Realizácia testu

Ihneď rozdeľte každý pripravený roztok do príslušnej skupiny BSK fliaš s použitím hadičky zo spodnej štvrtiny (nie z dna) vhodne veľkej fľaše, tak aby všetky BSK fľaše boli úplne naplnené. Jemne trasením odstráňte všetky vzduchové bubliny. Okamžite analyzujte v nulovom čase rozpustený kyslík Winklerovou alebo elektródovou metódou. Obsah fliaš sa môže zakonzervovať pre neskoršiu analýzu Winklerovou metódou pridaním síranu manganatého (II) a hydroxidu sodného (prvý Winklerov reagent). Uskladnite starostlivo uzavreté fľaše obsahujúce zafixovaný kyslík ako hnedý hydratovaný (III) oxid manganitý v tme pri teplote 10 až 20 °C nie dlhšie ako 24 hodín pred vykonaním zostávajúcich krokov Winklerovej metódy. Uzavrite zostávajúce paralelné fľaše tak, aby sa zaistilo, že nie sú uzavreté žiadne vzduchové bubliny, a inkubujte za tmy pri teplote 20 °C. Každá séria musí byť spolu s kompletnou paralelnou sériou na stanovenie slepého pokusu inokulovaného média. Odoberte aspoň po dve fľaše zo všetkých sérií na analýzu rozpusteného kyslíka v časových intervaloch (aspoň týždenne) počas 28-dňovej inkubácie.

Týždenné odbery vzoriek umožnia hodnotenie percentuálneho odstránenia v 14-dňovom okne, avšak odbery každé 3 až 4 dni by mali umožniť identifikovať 10-dňové okno, čoby vyžadovalo dvojnásobok fliaš.

Pre testované látky obsahujúce dusík by sa mali vykonať korekcie na spotrebu kyslíka prípadnou nitrifikáciou. Aby sa toto vykonalo, použite metódu kyslíkovej elektródy na stanovenie koncentrácie rozpustného kyslíka a potom odoberte vzorku z BSK fľaše na analýzu dusitanov a dusičnanov. Z nárastu koncentrácie dusitanov a dusičnanov vypočítajte spotrebovaný kyslík (pozri prílohu V).

VI.3. ÚDAJE A SPRÁVA

VI.3.1. **Spracovanie výsledkov**

V prvom rade vypočítajte BSK získaný po každej časovej perióde odpočítaním spotreby kyslíka (mg O_2/liter) v inokulovom slepom pokuse od spotreby kyslíka testovanou látkou alebo prípravkom. Vydeľte túto upravenú spotrebu koncentráciou (mg/liter) testovanej látky alebo prípravku, aby sa získala špecifická hodnota BSK ako mg kyslíka na mg testovanej látky alebo prípravku. Vypočítajte percento biodegradovateľnosti vydelením špecifickej hodnoty BSK so špecifickou hodnotou ThOD (vypočítanou podľa prílohy II.2) alebo CHSK (stanovené analýzou, pozri prílohu II.3), potom:

$$\text{BOD} = \frac{\text{mg spotreby } O_2 \text{testovanej} - \text{mg spotreby } O_2 \text{ slepého pokusu}}{(\text{BSK})}$$

▼B

= mg O_2 na mg testovanej látky alebu prípravku

$$\% \text{ degradácie } = \frac{\text{BOD (mg } O_2\text{/mg BSK (mg } O_2\text{/mg testovanej chemickej látky))}}{\text{ThOD(mg } O_2\text{/mg ThOD (mg } O_2\text{/mg testovanej chemickej látky))}} \times 100$$

alebo

$$\% \text{ degradácie } = \frac{\text{BOD (mg } O_2\text{/mg BSK (mg } O_2\text{/mg testovanej chemickej látky))}}{\text{COD(mg } O_2\text{/mg CHSK (mg } O_2\text{/mg testovanej chemickej látky))}} \times 100$$

Je potrebné poznamenať, že tieto dve metódy nemusia nutne poskytovať rovnakú hodnotu, uprednostňuje sa použitie prvej metódy.

Pre testované látky obsahujúce dusík použite vhodné ThOD (NH_4 alebo NO_3) podľa toho, čo je známe alebo sa očakáva o výskyte nitrifikácie (pozri prílohu II.2). Ak dôjde k výskytu nitrifikácie, ale nie úplnej, vypočítajte úpravu na kyslík spotrebovaný nitrifikáciou zo zmien v koncentrácii dusitanov a dusičnanov (dodatok 5).

VI.3.2. **Platnosť výsledkov**

Spotreba kyslíka v inokulovom slepom pokuse by nemala presahovať 1,5 mg rozpusteného O_2/liter po 28 dňoch. Hodnoty vyššie ako táto vyžadujú prehodnotenie a posúdenie experimentálnych techník. Počas celého testu by sa nemala zvyšková koncentrácia kyslíka znížiť pod 0,5 mg/liter. Takéto nízke hladiny kyslíka sú platné, len ak metódy stanovenia rozpustného kyslíka sú schopné presne merať takéto nízke koncentrácie.

Pozri tiež I.5.2.

VI.3.3. **Správa**

Pozri I.8.

VI.4. KARTA ÚDAJOV

Príklad karty údajov je uvedený ďalej.

TEST UZAVRETEJ FĽAŠE

1. **LABORATÓRIUM**

2. **DÁTUM ZAČIATKU TESTU**

3. **TESTOVANÁ LÁTKA ALEBO PRÍPRAVOK**

   Názov:

   Koncentrácia zásobného roztoku: ... mg/liter

   Počiatočná koncentrácia vo fľaši: ... mg/liter

   ThOD alebo CHSK: ... mg O_2/mg testovanej látky

4. **INOKULUM**

   Zdroj:

   Úprava:

▼B

Prekondiciovanie, ak sa vykonalo:

Koncentrácia v reakčnej zmesi: … mg/liter

5. **STANOVENIE ROZPUSTENÉHO KYSLÍKA**

Metóda: Winklerova/elektródová

Analýzy baniek

Doba inkubácie (d)			Rozpustený kyslik (mg/l)			
			0	n_1	n_2	
Test naslepo (bez chemickej látky)	1	C_1				
	2	C_2				
Priemer	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Testovaná chemická látka	1	a_1				
	2	a_2				
Priemer	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Poznámka: Podobná tabuľka sa môže použiť pre referenčnú látku a na kontrolu toxicity

6. **KOREKCIA NA NITRIFIKÁCIU (POZRI PRÍLOHU V)**

Doba inkubácie d)		0	n_1	n_2	n_3
i)	Koncentrácia dusičnanov (mg N na liter)				
ii)	Zmena koncentrácie dusičnanov (mg N na liter)	—			
ii)	Kyslíkový ekvivalent (mg/l)	—			
iv)	Koncentrácia dusitanov (mg N na liter)				
v)	Zmena koncentrácie dusitanov (mg N na liter)	—			
vi)	Kyslíkový ekvivalent (mg/l)	—			
iii + vi)	Celkový kyslíkový ekvivalent (mg/l)	—			

7. **SPOTREBA ROZPUSTENÉHO KYSLÍKA: % DEGRADÁCIE**

	Spotreba po n dňoch (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
BANKA 1: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				
BANKA 2: $(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})$				

▼B

	Spotreba po n dňoch (mg/l)			
	n_1	n_2	n_3	
BANKA 1: $\%\ D_1 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{koncentrácia látky} \times \text{ThOD látky}}$				
BANKA 2: $\%\ D_2 = \frac{[(m_{to} - m_{tx}) - (m_{bo} - m_{bx})] \times 100}{\text{koncentrácia látky} \times \text{ThOD látky}}$				
$\%\ D \text{ priemer } (*) = \frac{D_1 - D_2}{2}$				

(*) Nepočítajte priemer, ak je výrazný rozdiel medzi paralelkami.

m_{to} = hodnota v skúšobnej banke v čase 0

m_{tx} = hodnota v skúšobnej banke v čase x

m_{bo} = stredná hodnota slepého pokusu v čase 0

m_{bx} = stredná hodnota slepého pokusu v čase x

Tiež aplikujte korekciu na nitrifikáciu z iii + vi v oddiele 6.

8. **SPOTREBA ROZPUSTENÉHO KYSLÍKA V SLEPOM POKUSE**

Spotreba kyslíka v slepom pokuse: ($m_{bo} - m_{b28}$) mg/liter. Táto spotreba je dôležitá pre platnosť testu. Mala by byť menšia ako 1,5 mg/liter.

ČASŤ VII. **TEST M.I.T.I.** (METÓDA C.4-F)

VII.1. PRINCÍP METÓDY

Spotreba kyslíka v miešanom roztoku alebo suspenzii testovanej látky alebo prípravku v minerálnom médiu, inokulovanom so špeciálne kultivovanými, neadaptovanými mikroorganizmami sa meria automaticky počas 28 dní v tmavom, uzavretom respirometri pri teplote 25 ± 1 °C. Vyvíjaný oxid uhličitý sa absorbuje nátronovým vápnom. Biodegradovateľnosť je vyjadrená v percentách spotreby kyslíka (korigované na spotrebu slepého pokusu) z teoretickej spotreby (ThOD). Percento primárnej biodegradovateľnosti sa tiež vypočíta z dodatočnej špecifickej analýzy vykonanej na začiatku a na konci inkubácie a prípadne z analýzy DOC.

VII.2. OPIS METÓDY

VII.2.1. **Prístroje**

a) automatický elektrolytický BSK-meter alebo respirometer, normálne vybavený 6 fľašami s 300 ml objemu a nádobami obsahujúcimi absorbent CO_2;

▼B

b) miestnosť s konštantnou teplotou a/alebo vodný kúpeľ s teplotou 25 ± 1 °C alebo presnejšie;

c) zariadenie na membránovú filtráciu (nepovinné);

d) analyzátor uhlíka (nepovinné).

VII.2.2. **Príprava minerálneho média**

S použitím látok analytickej čistoty a vody pripravte tieto zásobné roztoky (I.6.1):

a)	Dihydrogénfosforečnan draselný, KH_2PO_4	8,50 g
	Hydrogénfosforečnan didraselný, K_2HPO_4	21,75 g
	Hydrogénfosforečnan dvoj sodný dodekahydrát Na_2HPO_4 12 H_2O	44,60 g
	Chlorid amónny, NH_4Cl	1,70 g
	Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter.	
	Hodnota pH roztoku musí byť 7,2.	
b)	Síran horečnatý heptahydrát, $MgSO_4$ 7 H_2O	22,50 g
	Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter.	
c)	Chlorid vápenatý bezvodý, $CaCl_2$	27,50 g
	Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter.	
d)	Chlorid železitý hexahydrát, $FeCl_3$ 6 H_2O	0,25 g
	Rozpustí sa vo vode a doplní na 1 liter.	

Odoberte 3 ml z každého roztoku a), b), c) a d) doplňte do 1 litra.

VII.2.3. **Príprava inokula**

Získajte čerstvé vzorky z najmenej desiatich miest, najmä z oblasti, kde sú použité a rozptýlené rozličné látky alebo prípravky. Z miest, ako sú čističky odpadových vôd, čističky vôd priemyselného odpadu, rieky, jazerá, more zhromaždite 1 liter vzorky kalu, povrchovej pôdy, vody atď. a zmiešajte ich spolu. Po odstránení plávajúcich látok a odstátí upravte hodnotu pH supernatantu na pH 7 ± 1 s hydroxidom sodným (NaOH) alebo s kyselinou fosforečnou (H_3PO_4).

Použite vhodný objem filtrovaného supernatantu na naplnenie nádoby s aktivovaným kalom a prevzdušňujte kvapalinu asi 23,5 hodiny. Tridsať minút po zastavení prevzdušňovania oddeľte asi jednu tretinu objemu supernatantu a pridajte rovnaký objem roztoku (pH 7) obsahujúceho 0,1 % glukózy, peptonu a dihydrofosforečnanu draselného k usadenému materiálu a znovu začnite prevzdušňovanie. Opakujte tento postup raz denne. Kalová jednotka musí fungovať podľa správnej praxe: výtok by mal byť číry, teplota by sa mala udržiavať na 25 ± 2 °C, hodnota pH má byť 7 ± 1, kal by sa mal dobre sedimentovať, dostatočné prevzdušňovanie by malo udržiavať zmes stále aeróbnu, mali by byť prítomne prvoky a aktivita kalu by sa mala testovať referenčnou látkou aspoň každé tri mesiace. Nepoužite kal ako inokulum skôr ako po jednom mesiaci, ale už nie po štyroch mesiacoch. Preto odoberte vzorku aspoň z 10 miest v pravidelných intervaloch, raz za tri mesiace.

▼B

Aby sa udržala rovnaká aktivita čerstvého a starého kalu, zmiešajte filtrovaný supernatant aktivovaného kalu, ktorý sa používa s rovnakým objemom filtrovaného supernatantu z čerstvo zhromaždenej zmesi z 10 miest, a kultivujte kombinovanú zmes, ako je vyššie uvedené. Použite kal ako inokulum po 18 až 24 hodinách po pridaní živín.

VII.2.4. **Príprava baniek**

Pripravte týchto 6 baniek:

Banka č. 1: testovaná látka alebo prípravok vo vode, 100 mg/liter.

Banka č. 2, 3 a 4: testovaná látka alebo prípravok v minerálnom médiu, 100 mg/liter.

Banka č. 5: referenčná látka alebo prípravok (napr. anilín) v minerálnom médiu 100 mg/liter.

Banka č. 6: samotné minerálne médium.

Slabo rozpustné testované chemické látky pridajte priamo, a to podľa ich hmotnosti alebo objemu, alebo s nimi zaobchádzajte podľa toho, ako je to uvedené v dodatku 3, okrem toho by sa nemali pridať rozpúšťadlá ani emulzifikátory. Pridajte absorbent CO_2 do všetkých príslušných nádob. Upravte hodnotu pH v bankách č. 2, 3 a 4 na 7,0.

VII.2.5. **Realizácia. testu**

Inokulujte banky č. 2, 3 a 4 (testované suspenzie), č. 5 (kontrola aktivity) a č. 6 (inokulový slepý pokus) s malým objemom inokula tak, aby sa dosiahla koncentrácia suspendovaných tuhých častíc 30 mg/l. Žiadne inokulum sa nepridáva do banky č. 1, ktorá slúži ako abiotická hodnota. Zložte zariadenie, skontrolujte vzduchotesnosť, zapnite miešadlá a začnite meranie spotreby kyslíka bez prístupu svetla. Denne kontrolujte teplotu, miešadlá a coulometricky záznamník spotreby kyslíka a zaregistrujte akékoľvek zmeny farby obsahov baniek. Odčítajte spotrebu kyslíka pre šesť baniek priamo pomocou vhodnej metódy, napr. zo šesťbodového zapisovača, ktorá poskytuje krivku BSK. Na konci inkubácie, normálne po 28 dňoch, odmerajte hodnotu pH obsahu baniek a stanovte koncentráciu zvyškovej testovanej látky alebo prípravku a akéhokoľvek medziproduktu a v prípade vo vode rozpustných látok vo vode koncentráciu DOC (pozri prílohu II.4). Zvláštna pozornosť sa musí venovať prchavým chemickým látkam. Ak sa predpokladá nitrifikácia, stanovte koncentráciu dusičnanov a dusitanov, ak je to možné.

VII.3. ÚDAJE A SPRÁVA

VII.3.1. **Spracovanie výsledkov**

Vydeľte spotrebu kyslíka (mg) testovanou látkou alebo prípravkom, po danom čase upravené na spotrebu kyslíka kontrolným inokulovým slepým pokusom po rovnakom čase, hmotnosťou použitej testovanej látky alebo prípravku. Tak sa získa BSK vyjadrený ako mg kyslíka/mg testovanej chemickej látky, t. j.

$$\text{BOD} = \frac{\text{mg spotreby } O_2 \text{ testovanou látkou} - \text{mg spotreby } O_2 \text{ slepého pokusu látkou}}{\text{mg testovanej látky alebo prípravku v banke}}$$

= mg O_2 na mg testovanej látky alebo prípravku.

▼B

Percentuálna biodegradácia sa potom získa z:

$$\%\ \text{biodegradácie} = \%\ \text{ThOD} = \frac{\text{BOD (mg } O_2\text{BSK (mg O2/mg látky alebo prípravku))}}{\text{ThOD (mg } O_2\text{/mg ThOD (mg O2mg látky alebo prípravku))}} \times 100$$

Pre zmesi vypočítajte ThOD z elementárnej analýzy tak ako pre jednotlivé látky alebo prípravky. Použite vhodný ThOD ($ThOD_{NH4}$, $ThOD_{NO3}$) podľa toho, či nedochádza k nitrifikácii, alebo či nitrifikácia prebieha kompletne (pozri prílohu II.2). Ak však nitrifikácia prebieha, ale je neúplná, vykonajte korekciu na kyslík spotrebovaný nitrifikáciou zo zmien v koncentráciách dusitanov a dusičnanov (dodatok 5).

Vypočítajte percento primárnej biodegradácie zo straty špecifickej (parentálnej, pôvodnej) látky alebo prípravku (pozri I.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\ \%$$

Ak došlo k strate testovanej látky alebo prípravku v banke č. 1, merajúcej fyzikálno-chemické odstránenie, uveďte to v správe a použite koncentráciu testovanej látky alebo prípravku (S_b) po 28 dňoch v tejto banke na výpočet percenta biodegradácie.

Ak sa vykonajú stanovenia DOC (nepovinné), vypočítajte percento konečnej biodegradácie z:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}}\right) \times 100\ \%$$

ako je opísané pod bodom I.7.1. Ak došlo k strate DOC v banke č. 1, merajúcej fyzikálno-chemické odstránenie, použite koncentráciu DOC v tejto banke na výpočet percenta biodegradácie.

Zaznamenajte všetky výsledky na pripojený záznamník údajov.

VII.3.2. **Platnosť výsledkov**

Spotreba kyslíka v inokulovom slepom pokuse je normálne 20 až 30 mg O_2 na liter a nemala by presahovať 60 mg/liter za 28 dní. Hodnoty vyššie ako 60 mg/liter vyžadujú kritické prehodnotenie údajov a experimentálnych techník. Ak je pH hodnota mimo rozsahu 6 až 8,5 a spotreba kyslíka testovanou látkou alebo prípravkom je menšia ako 60 %, potom by sa mal test zopakovať s nižšou koncentráciou testovanej látky.

Pozri tiež I.5.2.

Ak percento degradácie anilínu, vypočítané zo spotreby kyslíka, nepresahuje 40 % po 7 dňoch a 65 % po 14 dňoch, test sa považuje za neplatný.

3.3. **Správa**

Pozri I.8.

VII.4. KARTA ÚDAJOV

Príklad karty údajov je uvedený nižšie.

TEST MITI (I)

1. **LABORATÓRIUM**

2. **DÁTUM ZAČIATKU TESTU**

▼B

3. **TESTOVANÁ LÁTKA**

Názov:

Koncentrácia zásobného roztoku: ... mg/liter chemickej látky.

Počiatočná koncentrácia v médiu C_o: ... mg/liter chemickej látky.

Objem reakčnej zmesi, V: ... ml.

ThOD: ... mg O_2/liter.

4. **INOKULUM**

Miesta odberu vzoriek kalu:

1. …
2. …
3. …
4. …
5. …
6. …
7. …
8. …
9. …
10. …

Koncentrácia suspendovaných tuhých častíc v aktivovanom kale po aklimatizácii so syntetickým výtokom = … mg/liter.

Objem aktivovaného kalu na liter konečného média = … ml.

Koncentrácia kalu v konečnom médiu = … mg/liter

5. **SPOTREBA KYSLÍKA: BIODEGRADOVATEĽNOSŤ**

Typ použitého respirometra:

			Čas (dni)				
			0	7	14	21	28
Spotreba O_2 (mg) testovanou látkou	a_1						
	a_2						
	a_3						
Spotreba O_2 (mg) v teste naslepo	b						
Korigovaná spotreba O_2 (mg)	$(a_1 - b_1)$ $(a_1 - b_1)$ $(a_1 - b_1)$						
BSK na mg testovanej	$\frac{(a-b)}{C_o V}$	Banka 1					
		Banka 2					
		Banka 3					
Rozklad v % $\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		1					
		2					
		3					
		Priemer ([1])					

([1]) Nepočítajte priemer, ak je výrazný rozdiel medzi paralelkami.

▼B

Poznámka: Podobné tabuľky sa môžu použiť pre referenčnú látku.

6. **ANALÝZA UHLÍKA (NEPOVINNÉ)**

Analyzátor uhlíka:

Banka	DOC				% odstráneného DOC	Priemer
	Nameraná hodnota		Korigovaná hodnota			
Voda + testovaná látka	a				—	—
Kal + testovaná látka	b_1		$b_1 - c$			
Kal + testovaná látka	b_2		$b_2 - c$			
Kal + testovaná látka	b_3		$b_3 - c$			
Kontrolný test naslepo	c		—		—	—

$$\% \text{ odstráneného } = \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **ÚDAJE ZO ŠPECIFICKEJ CHEMICKEJ ANALÝZY**

	Zvyškové množstvo testovanej chemickej látky na koci testu	degradácia v %
Test naslepo s vodou	S_b	
Inokulované médium	S_{a1}	
	S_{a2}	
	S_{a3}	

$$\% \text{ degradácie } = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Vypočítaje % degradácie pre banky a1, a2, a a3.

8. **POZNÁMKY**

Ak je to možné, mala by sa pripojiť krivka závislosti BSK od času.

▼B

DODATOK 1

SKRATKY A POJMY

DO: Rozpustený kyslík (mg/liter) je koncentrácia rozpusteného kyslíka vo vodnej vzorke.

BSK: Biochemická spotreba kyslíka (g) je množstvo spotrebovaného kyslíka mikroorganizmami počas metabolizovania testovanej látky alebo prípravku, tiež vyjadrené ako g spotrebovaného kyslíka na g testovanej chemickej látky (pozri metódu C.5).

CHSK: Chemická spotreba kyslíka (g) je množstvo spotrebovaného kyslíka počas oxidácie testovanej látky alebo prípravku v teplom, okyslenom dvojchrómane; umožňuje meranie množstva prítomnej oxidovateľnej látky; tiež vyjadruje spotrebovaný kyslík v g na g testovanej látky alebo prípravku (pozri metódu C.6).

DOC: Rozpustený organický uhlík je organický uhlík prítomný v roztoku alebo ten, ktorý prechádza cez 0,45-mikrometrový filter alebo ostáva v supernatante po odstredení pri 40 000 $m.s^{-2}$ (± 4 000 g) počas 15 minút.

ThOD: Teoretická spotreba kyslíka (mg) je teoretické množstvo kyslíka, ktoré sa požaduje na kompletnú oxidáciu látky alebo prípravku; vypočíta sa z molekulového vzorca (pozri prílohu II.2) a je tiež vyjadrená v mg kyslíka potrebných na mg testovanej látky.

$ThCO_2$: Teoretický oxid uhličitý (mg) je vypočítané množstvo oxidu uhličitého, ktoré sa vytvorí zo známeho alebo odmeraného obsahu uhlíka v testovanej látke alebo prípravku, keď je kompletne mineralizovaná; je tiež vyjadrený v mg oxidu uhličitého uvoľneného z mg testovanej látky alebo prípravku.

TOC: Celkový organický uhlík vzorky je súhrn organického uhlíka v roztoku a v suspenzii.

IC: Anorganický uhlík.

TC: Celkový uhlík je súhrn organického a anorganického uhlíka prítomného vo vzorke.

Primárna biodegradácia:

je zmena v štruktúre látky, spôsobená biologickým účinkom, ktorá má za následok stratu špecifickej vlastnosti tejto látky.

Úplná biodegradácia (aeróbna):

je taká dosiahnutá úroveň degradácie, keď testovanú látku alebo prípravok úplne spotrebujú mikroorganizmy, čoho výsledkom je tvorba oxidu uhličitého, vody, minerálnych solí a nových mikrobiálnych bunkových zložiek (biomasy).

Ľahko biodegradovateľné:

je dohodnutá klasifikácia chemických látok, ktoré prešli cez určité špecifické skríningové testy na úplnú biodegradovateľnosť; tieto testy sú také prísne, že sa predpokladá, že takéto látky alebo prípravky sa budú rýchlo a úplne biodegradovať vo vodnom prostredí v aeróbnych podmienkach.

▼B

Inherentne (prirodzene) biodegradovateľné:

je klasifikácia chemických látok, pre ktoré existuje jednoznačný dôkaz ich biodegradácie (primárnej alebo úplnej) v každom uznanom teste na biodegradovateľnosť.

Odbúrateľnosť:

je poddajnosť látok, aby boli odbúrané počas biologického čistenia odpadovej vody bez škodlivého ovplyvnenia normálneho priebehu procesov čistenia. Všeobecne možno konštatovať, že ľahko biodegradovateľné látky sú odbúrateľné, ale to sa už nedá konštatovať o všetkých vnútorne biodegradovateľných látkach. Do odbúrania môžu byť zapojené aj abiotické procesy.

Fáza lag:

je čas od inokulácie, v teste Die-Away, po dosiahnutí aspoň 10 % degradácie. Fáza lag je často veľmi variabilná a slabo reprodukovateľná.

Doba trvania degradácie:

je čas od konca fázy lag až po čas, kým sa nedosiahne 90 % degradácia.

10-dňové okno:

je 10 dní nasledujúcich po dosiahnutí 10 % degradácie.

▼B

DODATOK 2

VÝPOČET A STANOVENIE VHODNÝCH SUMÁRNYCH PARAMETROV

Určité sumárne parametre sa budú vyžadovať v závislosti od zvolenej metódy. Nasledujúca časť opisuje odvodenie týchto hodnôt. Použitie týchto parametrov je opísané pri jednotlivých metódach.

1. **Obsah uhlíka**

Obsah uhlíka sa vypočíta zo známeho elementárneho zloženia alebo sa stanoví elementárnou analýzou testovanej látky.

2. **Teoretická spotreba kyslíka (ThOD)**

Teoretická spotreba kyslíka (ThOD) sa môže vypočítať, ak je známe elementárne zloženie alebo stanovené elementárnou analýzou. Je pre látku

$C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$

bez nitrifikácie

$$ThOD_{NH4} = \frac{16[2\,c + 1/2(h - cl - 3\,n) + 3\,s + 5/2\,p + 1/2\,na - o]}{MW}\ mg/mg$$

alebo s nitrifikáciou,

$$ThOD_{NO3} = \frac{16[2\,c + 1/2(h - cl) + 5/2\,n + 3\,s + 5/2\,p + 1/2\,na - o]}{MW}\ mg/mg$$

3. **Chemická spotreba kyslíka (CHSK)**

Chemická spotreba kyslíka (CHSK) je stanovená podľa metódy C.6.

4. **Rozpustený organický uhlík (DOC)**

Rozpustený organický uhlík (DOC) je v súlade s pojmami organický uhlík každej látky alebo prípravku, alebo zmesi vo vode prechádzajúci cez 0,45-mikrometrový filter.

Vzorky z testovaných nádob sa odoberajú a filtrujú okamžite vo filtračnom prístroji s použitím vhodného membránového filtra. Prvých 20 ml (množstvo sa môže zredukovať, keď sa používajú malé filtre) sa odstráni. Objemy 10 až 20 ml alebo nižšie, ak sú injektované (objem závisí od požadovaného množstva pre analyzátor uhlíka), sa nechávajú na analýzu uhlíka. Koncentrácia DOC sa stanoví pomocou analyzátora organického uhlíka, ktorý je schopný presne merať koncentráciu uhlíka ekvivalentnú alebo nižšiu ako 10 % počiatočnej koncentrácie DOC použitej v teste.

Filtrované vzorky, ktoré sa nemôžu analyzovať v ten istý pracovný deň, sa môžu chrániť skladovaním v chladničke pri teplote 2 – 4 °C počas 48 hodín alebo pri teplote pod –18 °C počas dlhšieho obdobia.

Poznámky:

Membránové filtre sú často impregnované povrchovo aktívnymi látkami kvôli hydrofilizácii. Takto filter môže obsahovať až niekoľko mg rozpustného organického uhlíka, ktorý by interferoval so stanovením biodegradability. Surfaktanty a iné rozpustné organické látky alebo prípravky sa odstraňujú z filtrov varom v deionizovanej vode trikrát po jednej hodine. Filtre sa potom môžu skladovať vo vode jeden týždeň. Ak sa použijú jednorazové filtre, je vždy potrebné sa presvedčiť, či neuvoľňujú rozpustný organický uhlík.

▼B

V závislosti od typu membránového filtra sa môže testovaná látka alebo prípravok zachytávať adsorpciou. Preto môže byť vhodné uistiť sa, že sa testovaná látka alebo prípravok nezachytáva na filtri.

Odstreďovanie pri 40 000 $m.s^{-2}$ (4 000 g) počas 15 minút možno použiť na rozlíšenie TOC od DOC namiesto filtrácie. Metóda nie je vhodná pri počiatočnej koncentrácii menšej ako 10 mg DOC/liter, pretože nie sú odstránené všetky baktérie alebo uhlík ako súčasť bakteriálnej plazmy je znovu rozpustený.

LITERATÚRA

— Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 12th ed, Am. Pub. Hlth. Ass., Am. Wat. Poll. Control Fed., Oxygen Demand, 1965, p. 65.

— Wagner, R., Von Wasser, 1976, vol. 46, 139.

— DIN-Entwurf 38 409 Teil 41 Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser-und Schlammuntersuchung, Summarische Wirkungs-und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoff-bedarfs (CSB) (H 41), Normenausschuß Wasserwesen (NAW) in DIN Deutsches Institut für Normung e.V.

— Gerike, P., The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13 (1), 169.

▼B

DODATOK 3

VYHODNOCOVANIE BIODEGRADOVATEĽNOSTI SLABO ROZPUSTNÝCH LÁTOK

Pri testoch biodegradovateľnosti slabo rozpustných látok je potrebné venovať pozornosť týmto požiadavkám.

Kým homogénne kvapaliny budú len zriedkavo predstavovať problém pri odbere vzoriek, odporúča sa, aby tuhé materiály boli homogenizované vhodným spôsobom, aby sa tak zabránilo chybám spôsobeným nehomogénnosťou. Špeciálnu pozornosť treba venovať v prípade požiadaviek na reprezentatívne vzorky niekoľkých miligramov zo zmesí látok alebo prípravkov, alebo látok s veľkým množstvom nečistôt.

Počas testov sa môžu použiť rôzne spôsoby miešania. Pozornosť by sa mala venovať len dostatočnému miešaniu, aby sa látka alebo prípravok udržiavali dispergované a aby sa zabránilo prehrievaniu, nadmernému peneniu a prílišným mechanickým silám.

Môže sa použiť emulzifikátor, ktorý zabezpečuje stabilnú disperziu látky alebo prípravku. Nemal by byť toxický pre baktérie a nesmie byť biodegradovateľný alebo spôsobovať penenie v podmienkach testu.

Pre rozpúšťadlá platia rovnaké kritériá ako pre emulzifikátor.

Neodporúča sa použitie pevných nosičov pre tuhé testované látky, ale môžu byť vhodné pre olejovité látky.

Pri použití pomocných látok, ako emulzifikátorov, rozpúšťadiel a nosičov, by sa mal vykonať slepý pokus s pomocnou látkou.

Každý z troch respirometrických testov CO_2, BSK, MITI sa môže použiť na výskum biodegradability slabo rozpustných látok alebo prípravkov.

LITERATÚRA

(1) de Morsier, A. et al., Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, vol. 16, 833.

(2) Gerike, P., The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

▼B

DODATOK 4

VYHODNOCOVANIE BIODEGRADOVATEĽNOSTI CHEMICKÝCH LÁTOK, PRI KTORÝCH EXISTUJE PODOZRENIE, ŽE SÚ TOXICKÉ PRE INOKULUM

Ak sa v teste ľahkej biodegradovateľnosti sa ukáže, že látka alebo prípravok nie sú biodegradovateľné, odporúča sa tento postup, ak je potrebné zistiť, či ide o inertnú látku, alebo dochádza k inhibícii (Reynolds et al., 1987).

Na testovanie toxicity a biodegradovateľnosti by sa mali použiť podobné alebo rovnaké inokulá.

Na vyhodnotenie toxicity látky alebo prípravku, skúmaných v testoch ľahkej biodegradovateľnosti, je vhodné použiť jeden z týchto testov alebo ich kombináciu: test inhibície aktivovaný kalom (inhibičný respirometrický test v aktívnom kale – smernica 88/302/EHS), BSK a/alebo metódy inhibície rastu.

Ak sa chceme vyhnúť inhibícii následkom toxicity, odporúča sa, aby koncentrácie testovanej látky použitej pri testovaní ľahkej biodegradovateľnosti boli menšie ako 1/10 hodnôt EC_{50} (alebo menšie ako hodnoty EC_{20}) získaných pri testovaní toxicity. Nie je pravdepodobné, aby látky s hodnotou EC_{50} väčšou ako 300 mg/liter mali toxické účinky v teste ľahkej biodegradovateľnosti.

Hodnoty EC_{50} menšie ako 20 mg/liter môžu pravdepodobne predstavovať vážne problémy pri následnom testovaní. Mali by sa použiť nízke skúšobné koncentrácie, ale potom je nutné použiť presný a citlivý test „uzavretej fľaše“ alebo použiť materiál označený ^{14}C. Prípadne aj aklimatizované inokulum umožňuje použitie vyšších koncentrácií testovanej látky. Avšak v tomto prípade sa stráca špecifické kritérium testu ľahkej biodegradovateľnosti.

LITERATÚRA

1. Reynolds, L. et al., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

▼B

DODATOK V

KOREKCIA NA SPOTREBU KYSLÍKA PRI INTERFERENCII NITRIFIKÁCIOU

Chyby spôsobené tým, že sa nitrifikácia neberie do úvahy pri hodnotení spotreby kyslíka pri teste biodegradovateľnosti látok neobsahujúcich dusík, sú okrajové (nie väčšie ako 5 %), a to aj v prípade, keď dochádza k rozdielnej oxidácii amóniového dusíka v teste a v slepom pokuse. V prípade testovaných látok, ktoré obsahujú dusík, však môže dôjsť k vážnym chybám.

Ak došlo k nekompletnej nitrifikácii, pozorovaná spotreba kyslíka reakčnou zmesou môže byť upravená na množstvo kyslíka použitého na oxidáciu amónia na dusitany a dusičnany, ak sú zmeny v koncentrácii dusitanov a dusičnanov počas inkubácie stanovené na základe týchto rovníc:

$$2\ NH_4Cl + 3O_2 = 2\ HN\ O_4 + 2\ HCl + 2\ H_4O \quad (1)$$

$$2\ HNO_4 + O_4 = 2\ HNO_2 \quad (2)$$

Celkovo:

$$2\ NH_2Cl + 4\ O_2 = 2\ HNO_3 + 2\ HCl + 2\ H_4O \quad (3)$$

Z rovnice (1) spotreba kyslíka 28 g dusíka obsiahnutého v chloride amónnom (NH_4Cl), ktorý je oxidovaný na dusitan, je 96 g, t. j. faktor 3,43 (96/28). Rovnakým spôsobom z rovnice (3), spotreba kyslíka, 28 g dusíka, ktorý je oxidovaný na dusičnan, je 128 g, t. j. faktor 4,57 (128/28).

Vzhľadom na to, že reakcie sa postupne vykonávajú rôznymi druhmi baktérií, je možné, aby koncentrácia dusitanov stúpala alebo klesala; v druhom prípade by malo dochádzať k ekvivalentnej tvorbe dusičnanov. Takto kyslík spotrebovaný pri tvorbe dusičnanov je 4,57-násobkom vzrastu koncentrácie dusičnanov a kyslík spojený s tvorbou dusitanov je 3,43-násobkom vzrastu koncentrácie dusitanov alebo s poklesom jeho koncentrácie strata kyslíka je - 3,43-násobkom poklesu koncentrácie.

To znamená:

O_2 spotrebovaný na tvorbu dusičnanov = 4,57 × nárast koncentrácie dusičnanov (4)

a

O_2 spotrebovaný na tvorbu dusitanov = 3,43 × nárast koncentrácie dusitanov (5)

a

O_2 spotrebovaný pri strate dusitanov = - 3,43 × pokles koncentrácie dusičnanov (6)

Takže:

O_2 spotrebovaný nitrifikáciou = ± 3,43 × zmena v koncentrácii dusitanov + 4,57 × nárast koncentrácie dusičnanov, (7)

a preto

O_2 spotrebovaný na oxidáciu C = celková pozorovaná spotreba – spotreba pri nitrifikácii (8)

Ak je alternatívne stanovený len celkový oxidovaný dusík, spotreba kyslíka nitrifikáciou sa môže považovať v prvom priblížení ako 4,57 × nárast oxidovaného dusíka.

Opravená hodnota spotreby kyslíka na oxidáciu C sa potom porovná s ThOD NH_3 vypočítanou podľa prílohy II.

▼B

C.5 DEGRADÁCIA – BIOCHEMICKÁ SPOTREBA KYSLÍKA

1. METÓDA

1.1. ÚVOD

Účelom metódy je meranie biochemickej spotreby kyslíka (BSK) tuhými alebo kvapalnými organickými látkami.

Údaje získané týmto testom sú vhodné pre látky rozpustné vo vode; avšak aspoň principiálne sa môžu testovať aj látky prchavé a slabo rozpustné vo vode.

Metóda je použiteľná len pre také testované organické materiály, ktoré neinhibujú baktérie pri koncentrácii použitej v teste. Ak testovaný materiál nie je rozpustný pri testovanej koncentrácii, môžu sa použiť špeciálne opatrenia ako ultrazvuková dispergácia, aby sa dosiahla dobrá dispergácia testovaného materiálu.

Informácie o toxicite látky alebo prípravku môžu byť užitočné na interpretáciu nízkych výsledkov a pri výbere vhodných skúšobných koncentrácií.

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Biochemická spotreba kyslíka (BSK) je definovaná ako množstvo rozpusteného kyslíka, ktoré si vyžaduje špecifikovaný objem roztoku látky na proces biochemickej oxidácie za predpísaných podmienok.

Výsledky sú vyjadrené v gramoch biochemickej spotreby kyslíka na gramy testovanej látky.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Je žiaduce použiť vhodnú referenčnú látku na skontrolovanie aktivity inokula.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Vopred stanovené množstvo látky, rozpustené alebo dispergované v dobre prevzdušnenom vhodnom médiu, sa inokuluje s mikroorganizmami a inkubuje pri konštantnej, definovanej okolitej teplote za tmy.

Biochemická spotreba kyslíka je stanovená rozdielom v obsahu rozpusteného kyslíka na začiatku a na konci testu. Test musí trvať aspoň 5 dní, ale nie dlhšie ako 28 dní.

Hodnota slepého pokusu sa musí stanoviť paralelným meraním za neprítomnosti testovanej látky.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Stanovenie biologickej spotreby kyslíka sa nemôže považovať za platné stanovenie biodegradovateľnosti látky. Tento test sa môže považovať len za skríningový test.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY

Predbežný roztok alebo disperzia látky sa pripraví s cieľom získať takú koncentráciu biochemickej spotreby kyslíka, ktorá bude kompatibilná s použitou metódou. Biochemická spotreba kyslíka sa potom stanoví akoukoľvek vhodnou vnútroštátnou alebo medzinárodnou štandardizovanou metódou.

▼B

2. **ÚDAJE A VYHODNOTENIE**

Biochemická spotreba kyslíka nachádzajúca sa v predbežnom roztoku sa vypočíta podľa vybraných normalizovaných metód a prevedie sa na gramy biochemickej spotreby kyslíka (BSK) na gram testovanej látky.

3. **SPRÁVA**

V správe z testu sa uvedie použitá metóda.

Biochemická spotreba kyslíka by mala byť strednou hodnotou (priemerom) aspoň z troch platných meraní.

Všetky informácie a poznámky, ktoré sú dôležité pre interpretáciu výsledkov, sa musia uviesť obzvlášť s ohľadom na nečistoty, fyzikálny stav, toxické účinky a vnútorné zloženie látky, ktoré by ovplyvňovalo výsledky.

Použitie prídavkov na inhibíciu biochemickej nitrifikácie sa musí takisto uviesť.

4. ODKAZY

Zoznam štandardizovaných metód, napríklad:

NF T 90 – 103: Determination of the biochemical oxygen demand.

NBN 407: Biochemical oxygen demand.

NEN 32355.4: Bepaling van het biochemish zuurstofverbruik (BZV).

The determination of biochemical oxygen demand, Methods for the examination of water and associated materials, HMSO, London.

ISO 5815: Determination of biochemical oxygen demand after n days.

▼B

C.6. **DEGRADÁCIA – CHEMICKÁ SPOTREBA KYSLÍKA**

1. **METÓDA**

1.1. ÚVOD

Účelom tejto metódy je meranie chemickej spotreby kyslíka tuhých alebo kvapalných organických látok štandardným spôsobom v stanovených laboratórnych podmienkach.

Informácie o vzorci látky budú potrebné pri vykonaní tohto testu a pri interpretácii získaných výsledkov (napr. halogenidy, železnaté soli organických zlúčenín, organochlórové zlúčeniny).

1.2. POJMY A JEDNOTKY

Chemická spotreba kyslíka je mierou oxidovateľnosti látky vyjadrená v ekvivalentných množstvách kyslíka oxidujúceho reagentu spotrebúvaného látkou v stanovených laboratórnych podmienkach.

Výsledok je vyjadrený v gramoch chemickej spotreby kyslíka na gram testovanej látky.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky nie je potrebné použiť vo všetkých prípadoch, keď sa skúma nová látka. Referenčné látky slúžia na kalibráciu metódy z času na čas, aby sa umožnilo porovnanie výsledkov, keď sa použije ďalšia metóda.

1.4. PRINCÍP SKÚŠOBNEJ METÓDY

Vopred stanovené množstvo látky, rozpustené alebo dispergované vo vode, sa oxiduje dvojchrómanom draselným v médiu obsahujúcom silný roztok kyseliny sírovej a síranu strieborného ako katalyzátora pod refluxom 2 hodiny. Zvyškový dvojchróman je stanovený titráciou so štandardizovaným síranom železnatoamónnym.

V prípade látok obsahujúcich chlór sa pridáva síran ortutnatý ([1]) na zníženie interferencie chlóru.

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Vzhľadom na dohodnuté podmienky stanovenia je chemická spotreba kyslíka (CHSK) „ukazovateľom oxidovateľnosti“ a ako taký sa používa ako praktická metóda na meranie organickej hmoty.

V tomto teste môžu rušiť chloridy; na stanovenie CHSK môžu mať takisto vplyv anorganické redukčné a oxidačné látky.

Niektoré cyklické látky a mnoho prchavých látok (napr. nižšie mastné kyseliny) nie sú úplne oxidovateľné týmto testovacím postupom.

1.6. OPIS SKÚŠOBNEJ METÓDY

Pripraví sa počiatočný roztok alebo disperzia látky tak, aby sa dosiahla chemická spotreba kyslíka (CHSK) od 250 do 600 mg/l.

([1]) S roztokmi obsahujúcimi ortutnaté soli sa po použití zaobchádza tak, aby nedošlo k prieniku ortuti do životného prostredia.

▼B

Poznámky:

V prípade slabo rozpustných a nedispergovateľných látok sa približne také množstvo práškovej látky alebo kvapaliny, ktoré zodpovedá 5 mg chemickej spotreby kyslíka, naváži a dá do experimentálneho prístroja s vodou.

Chemická spotreba kyslíka (CHSK) sa často a špeciálne v prípade slabo rozpustných látok stanoví výhodne rôznymi modifikáciami tejto metódy, napr. v uzavretom priestore s vyrovnávaním tlaku (K. Kelkenberg, 1975). V tejto modifikácii látok, ktoré sú len ťažko stanoviteľné konvenčnou metódou – napríklad kyselina octová – sa môžu často úspešne kvantifikovať. Avšak táto metóda zlyháva v prípade pyridínu. Ak sa koncentrácia dvojchrómanu draselného, ako je uvedená v odkaze (1), zvýši na 0,25 N (0,0416 M), priame naváženie 5 mg až 10 mg látky je uľahčené, čo je nevyhnutné pre stanovenie chemickej spotreby kyslíka slabo rozpustných látok vo vode [odkaz (2)].

Chemická spotreba kyslíka sa stanoví akoukoľvek vnútroštátnou alebo medzinárodnou štandardizovanou metódou.

2. ÚDAJE A VYHODNOTENIE

Chemická spotreba kyslíka obsiahnutá v experimentálnej banke sa vypočíta podľa vybranej normalizovanej metódy a konvertuje sa na gramy chemickej spotreby kyslíka na gram testovanej látky.

3. SPRÁVA

V správe z testu sa uvedie odkaz na použitú metódu.

Chemická spotreba kyslíka by mala byť strednou hodnotou aspoň z troch platných meraní. Všetky informácie a poznámky, ktoré sú relevantné pre interpretáciu výsledkov, sa uvedú s ohľadom na nečistoty, fyzikálny stav, toxické účinky a vnútorné vlastnosti látky (ak sú známe), ktoré by ovplyvňovali výsledky.

Použitie síranu ortutnatého na minimalizovanie interferencie chloridu sa musí tiež uviesť.

4. ODKAZY

(1) Kelkengerg, H., Z. von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.

(2) Gerike P. The biodegradibility testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

Zoznam štandardizovaných metód, napríklad:

NBN T 91-201 Determination of the chemical oxygen demand.

ISBN O 11 7512494 Chemical oxygen demand (dichromate value) of polluted and waste waters.

NF T 90-101 Determination of chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis Determination of chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of chemical oxygen demand (CHSK) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3: Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060: Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

▼B

C.7. DEGRADÁCIA – ABIOTICKÁ DEGRADÁCIA: HYDROLÝZA AKO FUNKCIA pH

1. METÓDA

Táto testovacia metóda je ekvivalentná OECD TG 111 (2004).

1.1. ÚVOD

Chemické látky sa môžu dostávať do povrchových vôd napríklad priamou aplikáciou, rozprášením, odtokom, kanalizáciou, zneškodňovaním odpadu, odpadovými vodami z priemyslu, domácností alebo poľnohospodárstva, atmosférickým vylučovaním a v týchto vodách sa môžu transformovať chemickými (napr. hydrolýzou a oxidáciou), fotochemickými a/alebo mikrobiálnymi procesmi. V tomto usmernení sa opisuje laboratórna testovacia metóda na posudzovanie abiotických hydrolytických transformácií chemických látok vo vodných systémoch pri takých hodnotách pH, aké sú bežné v životnom prostredí (pH 4 – 9) a usmernenie je založené na súčasných usmerneniach [pozri odkazy na literatúru (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7)].

Experimenty sa vykonávajú na stanovenie i) rýchlosti hydrolýzy testovanej látky ako funkcie pH a ii) identity alebo povahy a rýchlosti tvorby a degradácie produktov hydrolýzy, ktorým môžu byť organizmy exponované. Takéto štúdie možno požadovať pre chemické látky, ktoré sa priamo aplikujú do vody alebo ktoré sa môžu dostať do životného prostredia inými uvedenými cestami.

1.2. DEFINÍCIE A JEDNOTKY

Pozri prílohu 2.

1.3. POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

Táto metóda je vo všeobecnosti použiteľná na chemické látky (neoznačené alebo označené), pre ktoré je dostupná analytická metóda s dostatočnou presnosťou a citlivosťou. Je použiteľná na málo prchavé a neprchavé látky s dostatočnou rozpustnosťou vo vode. Test by sa nemal používať na veľmi prchavé chemické látky, ktoré sa z vody ľahko uvoľňujú (napr. vyparujúce sa látky, organické rozpúšťadlá) a nemožno ich udržať v roztoku pri experimentálnych podmienkach na vykonávanie tohto testu. Tento test možno ťažko uskutočniť s látkami, ktoré vykazujú minimálnu rozpustnosť vo vode [(pozri odkaz na literatúru (8)].

1.4. PODSTATA TESTOVACEJ METÓDY

Do sterilných vodných tlmivých roztokov s rozličnou hodnotou pH (pH 4, 7 a 9) sa pridá testovaná látka a nechajú sa inkubovať v tme za kontrolovaných laboratórnych podmienok (pri konštantnej teplote). Po uplynutí príslušných časových intervalov sa tlmivé roztoky analyzujú z hľadiska testovanej látky a produktov hydrolýzy. Použitím značenej testovanej látky (napr. ^{14}C) možno ľahšie určiť látkovú bilanciu.

Táto testovacia metóda je vypracovaná ako viacstupňový prístup, ktorý je znázornený a vysvetlený v dodatku 1. Každý stupeň vychádza z výsledkov predchádzajúceho stupňa.

▼B

1.5. INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

Na meranie miery hydrolýzy možno použiť neznačenú alebo značenú testovaciu látku. Vo všeobecnosti sa pri štúdiu mechanizmu hydrolýzy a určenia látkovej bilancie dáva prednosť značenému materiálu; v osobitných prípadoch však značenie nemusí byť absolútne nevyhnutné. Odporúča sa značenie izotopom ^{14}C, užitočné však môže byť aj značenie inými izotopmi, ako napríklad ^{13}C, ^{15}N alebo ^{3}H. Pokiaľ je to možné, značka by sa mala umiestniť do najstabilnejšej časti (najstabilnejších častí) molekuly. Ak napríklad molekula testovanej látky obsahuje jeden kruh, požaduje sa značenie na tomto kruhu; ak testovaná látka obsahuje dva kruhy alebo viacero kruhov, môže vzniknúť potreba vykonať individuálne štúdie o vyhodnotení osudu každého značeného kruhu na získanie vhodných informácií o tvorbe produktov hydrolýzy. Čistota testovanej látky by mala byť aspoň 95 %.

Pred vykonaním testu hydrolýzy by mali byť k dispozícii tieto informácie o testovanej látke:

a) rozpustnosť vo vode [testovacia metóda A.6];

b) rozpustnosť v organických rozpúšťadlách;

c) tlak pár [testovacia metóda A.4] a/alebo Henryho konštanta;

d) rozdeľovací koeficient n-oktanol/voda [testovacia metóda A.8];

e) disociačná konštanta (pK_a) [usmernenie OECD 112] (9);

f) v odôvodnenom prípade rýchlosť priamej a nepriamej fototransformácie vo vode.

Mali by byť dostupné analytické metódy stanovenia množstva testovanej látky, a ak je to dôležité, aj identifikácie a stanovenia množstva produktov hydrolýzy vo vodných roztokoch (pozri aj časť 1.7.2).

1.6. REFERENČNÉ LÁTKY

Ak je to možné, na identifikáciu a stanovenie množstva produktov hydrolýzy spektroskopickými, chromatografickými alebo inými vhodnými citlivými metódami by sa mali použiť referenčné látky.

1.7. KRITÉRIÁ KVALITY

1.7.1. **Výťažnosť**

Analýza aspoň dvoch tlmivých roztokov alebo ich extraktov vykonaná ihneď po pridaní testovanej látky poskytuje prvú indikáciu opakovateľnosti analytickej metódy a jednotnosti aplikačného postupu pre testovanú látku. Výťažnosti pre neskoršie štádiá experimentov vyplývajú z príslušných látkových bilancií (pri použití značeného materiálu). Výťažky by mali byť v rozsahu od 90 % do 110 % (7) pri značených aj neznačených chemických látkach. V prípade, že je technicky náročné dosiahnuť tento rozsah, pre neznačené chemické látky je prijateľná výťažnosť 70 %, treba však uviesť zdôvodnenie.

▼B

1.7.2. **Opakovateľnosť a citlivosť analytickej metódy**

Opakovateľnosť analytickej metódy (analytických metód) používanej (používaných) neskôr na stanovenie množstva testovanej látky a produktov hydrolýzy možno overiť duplikátnou analýzou rovnakých tlmivých roztokov (alebo ich extraktov) po vytvorení dostatočného množstva produktov hydrolýzy na stanovenie množstva.

Analytická metóda by mala byť dostatočne citlivá na stanovenie množstva testovanej látky pri jej koncentrácii 10 % alebo pri nižšej východiskovej koncentrácii. Ak je to relevantné, analytické metódy by mali byť dostatočne citlivé, aby bolo možné stanoviť množstvo akéhokoľvek produktu hydrolýzy predstavujúci 10 % alebo viac aplikovanej (v ktoromkoľvek čase počas vykonávania štúdie) do 25 % alebo ešte menej jeho maximálnej koncentrácie.

1.7.3. **Intervaly spoľahlivosti pre kinetické údaje hydrolýzy**

Intervaly spoľahlivosti by sa mali vypočítať a uviesť pre všetky regresné koeficienty, rýchlostné konštanty, polčasy degradácie a akékoľvek ďalšie kinetické parametre (napr. DT50).

1.8. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.8.1. **Zariadenie a aparatúra**

Štúdia by sa mala vykonávať v sklených nádobách (napr. skúmavkách, malých bankách), v tme a sterilných podmienkach, ak treba, pokiaľ z predchádzajúcich informácií (napr. zo stanovenia rozdeľovacieho koeficientu n-oktanol-voda) nevyplýva, že testovaná látka môže priľnúť ku sklu. V takýchto prípadoch môže nastať nutnosť zvážiť použitie alternatívnych materiálov (napr. teflónu). Takisto je možné problém priľnavosti ku sklu zmierniť použitím jednej alebo viacerých z týchto metód:

— stanovenie hmotnosti testovanej látky a produktov hydrolýzy sorbovaných na testovacej nádobe,

— použitie ultrazvukového kúpeľa,

— zabezpečenie umytia všetkých sklených nádob rozpúšťadlom v každom intervale odberu vzorky,

— použitie zložených produktov,

— použitie zvýšeného množstva prídavného riedidla pri pridávaní testovanej látky do systému; ak sa použije prídavné riedidlo, malo by sa použiť také riedidlo, ktoré nespôsobuje hydrolýzu testovanej látky.

Bežne sa vyžaduje použitie vodných trepačiek s reguláciou teploty alebo termostaticky riadených inkubátorov na inkubáciu rozličných testovacích roztokov.

Ďalej sa vyžaduje štandardné laboratórne vybavenie, najmä toto:

— pH meter,

▼B

— analytické prístroje, ako napríklad zariadenia GC, HPLC, TLC, vrátane príslušných detekčných systémov na analyzovanie neznačených a rádioizotopmi značených látok alebo na metódu riedenia inverzných izotopov,

— prístroje na účely identifikácie (napr. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR atď.),

— kvapalinový scintilačný čítač,

— oddeľovacie lieviky na extrakciu kvapaliny kvapalinou,

— zariadenia na koncentrovanie roztokov a extraktov (napr. rotačná odparka),

— zariadenie na reguláciu teploty (napr. vodný kúpeľ).

Medzi používané chemické reagenty patria napríklad:

— organické rozpúšťadlá analytickej čistoty, napr. hexán, dichlórmetán atď.,

— scintilačná kvapalina,

— tlmivé roztoky (podrobnosti pozri v časti 1.8.3).

Všetko laboratórne sklo, čistá voda a tlmivé roztoky používané na testy hydrolýzy by sa mali sterilizovať.

1.8.2. **Aplikácia testovanej látky**

Testovaná látka by sa mala aplikovať ako vodný roztok do rôznych tlmivých roztokov (pozri prílohu 3). Ak je to potrebné pre správne rozpustenie, povoľuje sa použiť malé množstvá rozpúšťadiel miešateľných s vodou (ako napr. acetonitrilu, acetónu, etanolu) na účely aplikácie a distribúcie testovanej látky, ale toto množstvo by nemalo presiahnuť 1 % v/v. V prípade, že sa uvažuje o použití vyššej koncentrácie rozpúšťadiel (napr. v prípade málo rozpustných testovaných látok), je to povolené len vtedy, ak možno preukázať, že riedidlo nemá vplyv na hydrolýzu testovaných látok.

Bežne sa neodporúča používať zložené produkty, pretože nemožno vylúčiť ovplyvnenie procesu hydrolýzy zloženými prísadami. Pri testovaných látkach, ktoré sú málo rozpustné vo vode, alebo pri látkach s priľnavosťou ku sklu (pozri časť 1.8.1) môže byť použitie zloženého materiálu vhodnou alternatívou.

Mala by sa používať jedna koncentrácia testovanej látky; táto koncentrácia by nemala byť vyššia ako 0,01 M alebo vyššia ako polovica nasýtenej koncentrácie (pozri prílohu 1).

▼B

1.8.3. **Tlmivé roztoky**

Test hydrolýzy by sa mal vykonávať pri hodnotách pH 4, 7 a 9. Na tento účel by sa mali pripraviť tlmivé roztoky použitím čistých chemikálií a vody. Niektoré užitočné tlmivé roztoky sú uvedené v dodatku 3. Treba poznamenať, že použitý systém tlmivého roztoku môže mať vplyv na rýchlosť hydrolýzy, a keď sa takýto jav pozoroval, mal by sa použiť tlmivý roztok s inými zložkami ([1]).

Hodnota pH každého tlmivého roztoku by sa mala prekontrolovať kalibrovaným pH-metrom, pri požadovanej teplote má byť presnosť aspoň 0,1 jednotky pH.

1.8.4. **Podmienky vykonania testu**

1.8.4.1. *Teplota pre teste*

Experiment s hydrolýzou by sa mal vykonávať pri konštantných teplotách. Na účely extrapolácie je dôležité udržiavať teplotu s presnosťou aspoň v rozmedzí ± 0,5 °C.

Ak nie je známe hydrolytické správanie sa testovanej látky, predbežný test (stupeň 1) by sa mal vykonávať pri teplote 50 °C. Kinetické testy vyššieho stupňa by sa mali vykonávať aspoň pri troch teplotách (vrátane testu pri 50 °C), pokiaľ nebolo v teste prvého stupňa stanovené, že testovaná látka je hydrolyticky stabilná. Navrhovaný teplotný rozsah je od 10 °C do 70 °C (prednostne s využitím jednej teploty nižšej ako 25 °C), ktorý zahŕňa uvádzanú teplotu 25 °C a väčšinu teplôt, ktoré sú v danom prostredí bežné.

1.8.4.2. *Svetlo a kyslík*

Všetky testy hydrolýzy by sa mali vykonávať s použitím akejkoľvek vhodnej metódy, aby sa zabránilo fotolytickému efektu. Pri všetkých meraniach sa treba vyhnúť prítomnosti kyslíka (napr. prebublávaním hélia, dusíka alebo argónu po dobu 5 minút pred prípravou roztoku).

1.8.4.3. *Doba trvania testu*

Predbežný test by mal trvať 5 dní kým testy vyššieho stupňa by mali trvať taký čas, aby zhydrolyzovalo 90 % testovanej látky alebo 30 dní, podľa toho, čo nastane skôr.

1.8.5. **Vykonanie testu**

1.8.5.1. *Predbežný test (stupeň 1)*

Predbežný test sa vykonáva pri teplote 50 °C ± 0,5 °C a pri hodnote pH 4,0, 7,0 a 9,0. Ak po 5 dňoch pozoruje hydrolýza nižšia ako 10 percent, ($t_{0,525°C}$ > 1 rok), testovaná látka sa pokladá hydrolyticky za stabilnú a bežne sa nevyžadujú ďalšie testy. Ak je látka známa ako nestabilná pri teplotách bežných v životnom prostredí ([2]), predbežný test sa nevyžaduje. Analytická metóda musí byť dostatočne presná a citlivá na detekciu zníženia celkovej pôvodnej koncentrácie o 10 percent.

([1]) Mabey a Mill odporúčali používať tlmivé roztoky bóritanu a acetátu namiesto fosfátu (11).

([2]) Takéto informácie môžu pochádzať z iných zdrojov, ako sú napríklad údaje o hydrolýze štruktúrne podobných zlúčenín z literatúry alebo z iných predbežných, polokvantitatívnych testov hydrolýzy s testovanou látkou v skoršom štádiu vývoja.

▼B

1.8.5.2. *Hydrolýza nestabilných látok (stupeň 2)*

Test vyššieho stupňa (pokročilý test) by sa mal vykonať pri hodnotách pH, pri ktorých bola zistená nestabilita testovanej látky, ako je to vymedzené v uvedenom predbežnom teste. Pufrované roztoky testovanej látky by sa mali uchovávať v termostatoch pri zvolených teplotách. Na vykonanie testu na reakcie prvého rádu by sa mal každý rekčný roztok analyzovať v časových intervaloch, ktorými sa získa minimálne šesť oddelených časových údajov, väčšinou v čase medzi 10 % až 90 % hydrolýzou testovanej látky. Jednotlivé vzorky opakovaných testov (minimálne dve duplikátne vzorky obsiahnuté v samostatných reakčných nádobách) by sa mali odobrať a ich obsah treba analyzovať v každom z minimálne šiestich intervaloch odberu vzoriek (aspoň pri dvanástich opakovaných údajových bodoch). Použitie jednej veľkej vzorky, z ktorej sa odoberajú jednotlivé malé množstvá testovaných roztokov v každom intervale odoberania vzoriek, sa pokladá za nevhodné, pretože neumožňuje sa tým analyzovať premenlivosť údajov a môže dôjsť k problémom súvisiacim s kontamináciou testovaného roztoku. Na konci testu vyššieho stupňa by sa mali vykonať testy potvrdenia sterilnosti (t. j. pri 90 % hydrolýze alebo po 30 dňoch). Ak sa však nepozorovala žiadna degradácia (t. j. transformácia), vykonanie testov sterilnosti sa nepokladá za potrebné.

1.8.5.3. *Identifikácia produktov hydrolýzy (stupeň 3)*

Všetky hlavné produkty hydrolýzy predstavujúce > 10 % aplikovanej dávky látky treba identifikovať vhodnými analytickými metódami.

1.8.5.4. *Voliteľné testy*

V prípade hydrolyticky nestabilnej testovanej látky môže byť potrebné vykonať ďalšie testy pri iných hodnotách pH ako 4, 7 a 9. Napríklad sa môže vyžadovať test v kyslejšom prostredí (napr. pri pH 1,2) pri jednej fyziologicky relevantnej teplote (37 °C).

2. **ÚDAJE**

Množstvo testovanej látky a produktov hydrolýzy, ak vznikajú, sa uvádzajú ako % z pôvodne aplikovanej koncentrácie, prípadne ako mg/l pre každý interval odberu vzorky pre jednotlivé hodnoty pH a teploty pri teste. Okrem toho by sa mala uviesť látková bilanciu v percentách pôvodne aplikovanej koncentrácie, ak bola použitá značená testovaná látka.

Malo by sa uviesť grafické znázornenie log-transformovaných údajov koncentrácií testovanej látky oproti času. Mali by sa identifikovať všetky hlavné produkty hydrolýzy, aspoň tie, ktoré predstavujú > 10 % aplikovanej dávky, a potom treba graficky zaznamenať ich log-transformované koncentrácie rovnakým spôsobom ako pre materskú látku, aby bolo možné zobraziť rýchlosť ich tvorby a degradácie.

▼B

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Presnejšie stanovenie hodnôt polčasov degradácie alebo DT_{50} sa dosiahne použitím výpočtov podľa vhodného kinetického modelu. Hodnoty polčasu degradácie a/alebo DT_{50} (vrátane medzí spoľahlivosti) by sa mali uviesť pre každú hodnotu pH a teplotu spolu s opisom použitého modelu, kinetického poriadku a koeficientu stanovenia (r^2). Výpočty by sa mali v prípade vhodnosti použiť aj pre produkty hydrolýzy.

V prípade, že sa štúdie rýchlosti hydrolýzy vykonávajú pri rôznych teplotách, mali by sa opísať pseudorýchlostné konštanty hydrolýzy prvé rádu (k_{obs}) ako funkcia teploty. Výpočet by mal byť založený jednak na rozdelení kobs na rýchlostné konštanty pre hydrolýzu kyslou katalýzou, neutrálnou a bázickou katalýzou (k_H, $k_{neutral}$, respektíve k_{OH}) a jednak na vzťahoch Arrheniovej rovnice:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i = H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

kde A_i a B_i sú regresné koeficienty úseku priamky respektíve sklonu najvhodnejších priamok vytvorených z lineárne klesajúceho ln k_i oproti prevrátenej hodnote absolútnej teploty v Kelvinoch (T). Pomocou využitia Arrheniových vzťahov pre hydrolýzu kyslú, neutrálnu a bázickú je možné vypočítať rýchlostné konštanty pseudoprvého rádu, a tým taktiež polčasy degradácie pre ostatné teploty, pre ktoré priame experimentálne stanovenie rýchlostnej konštanty nie je vykonateľné (10).

2.2. VYHODNOTENIE A VÝKLAD VÝSLEDKOV

Väčšina hydrolytických reakcií sa riadi zjavnými reakčnými rýchlosťami prvého rádu, a preto sú polčasy degradácie nezávislé od koncentrácie (pozri rovnicu 4 v dodatku 2). To zvyčajne umožňuje používanie laboratórnych výsledkov stanovených pri 10^{-2} až 10^{-3} M v podmienkach v životného prostredia (< 10^{-6} M) (pozri odkaz na literatúru 10). Mabey a Mill (pozri odkaz 11) uviedli viacero príkladov zhody medzi rýchlosťami hydrolýzy nameranej ako v čistej, tak aj v prírodnej vode pri mnohých chemických látkach s tým, že sa merala hodnota pH aj teplota.

3. **VYPRACOVANIE SPRÁVY**

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí obsahovať aspoň tieto informácie:

Testovaná látka:

— bežný názov, chemický názov, číslo CAS, štruktúrny vzorec (s vyznačením umiestnenia značky, ak sa používa značkovanie rádioaktívnym izotopom) a príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti (pozri časť 1.5),

— čistota (nečistoty) testovanej látky,

— čistota značky chemickej látky značenej rádioaktívnym izotopom a mólová aktivita (ak j e to vhodné).

▼B

— Tlmivé roztoky

— dátumy a podrobnosti o príprave,

— použité tlmivé roztoky a použité vody,

— molarita a hodnota pH tlmivých roztokov.

Podmienky vykonávania testu:

— dátumy vykonávania štúdií,

— množstvo aplikovanej testovanej látky,

— metóda a rozpúšťadlá (typ a množstvo) použité na aplikáciu testovanej látky,

— objem inkubovaných tlmivých roztokov testovanej látky,

— opis použitého inkubačného systému,

— hodnota pH a teplota počas vykonávania štúdie,

— časy odberu vzoriek,

— metóda (metódy) extrakcie,

— metódy stanovenia a identifikácie testovanej látky a jej produktov hydrolýzy v tlmivých roztokoch,

— počet opakovaní.

Výsledky:

— opakovateľnosť a citlivosť použitých analytických metód,

— výťažnosť (% hodnoty sú pre platné štúdie uvedené v časti 1.7.1),

— opakované údaje a stredné hodnoty v tabuľkovej forme,

— látková bilancia počas vykonávania štúdií a na jeho konci (pri použití značenej testovanej látky),

— výsledky predbežného testu,

— rozbor a výklad výsledkov,

— všetky pôvodné údaje a čísla.

Nasledujúce informácie sa vyžadujú iba pri stanovení rýchlosti hydrolýzy:

— grafické znázornenie koncentrácií v prípade testovanej látky oproti času, a ak je to vhodné, aj v prípade produktov hydrolýzy pre každú hodnotu pH a teplotu,

— tabuľky výsledkov Arrheniovej rovnice pre teplotu 20 °C/25 °C, s uvedením hodnoty pH, rýchlostnej konštanty [h^{-1} alebo $deň^{-1}$], polčasu degradácie alebo DT_{50}, teploty [C] vrátane medzí spoľahlivosti a korelačných koeficientov (r^2) alebo porovnateľné informácie,

— navrhovaný mechanizmus hydrolýzy.

▼B

4. **ODKAZY NA LITERATÚRU**

(1) OECD (1981). Hydrolysis as a Function of pH. OECD Guideline for Testing of Chemicals Nr. 111, adopted 12 May 1981.

(2) US-Environmental Protection Agency (1982). 40 CFR 796.3500, Hydrolysis as a Function of pH at 25 °C. Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(3) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(4) European Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex V: Fate and Behaviour in the Environment.

(5) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (October 1980).

(7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(8) OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Nr. 23.

(9) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994 – 2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

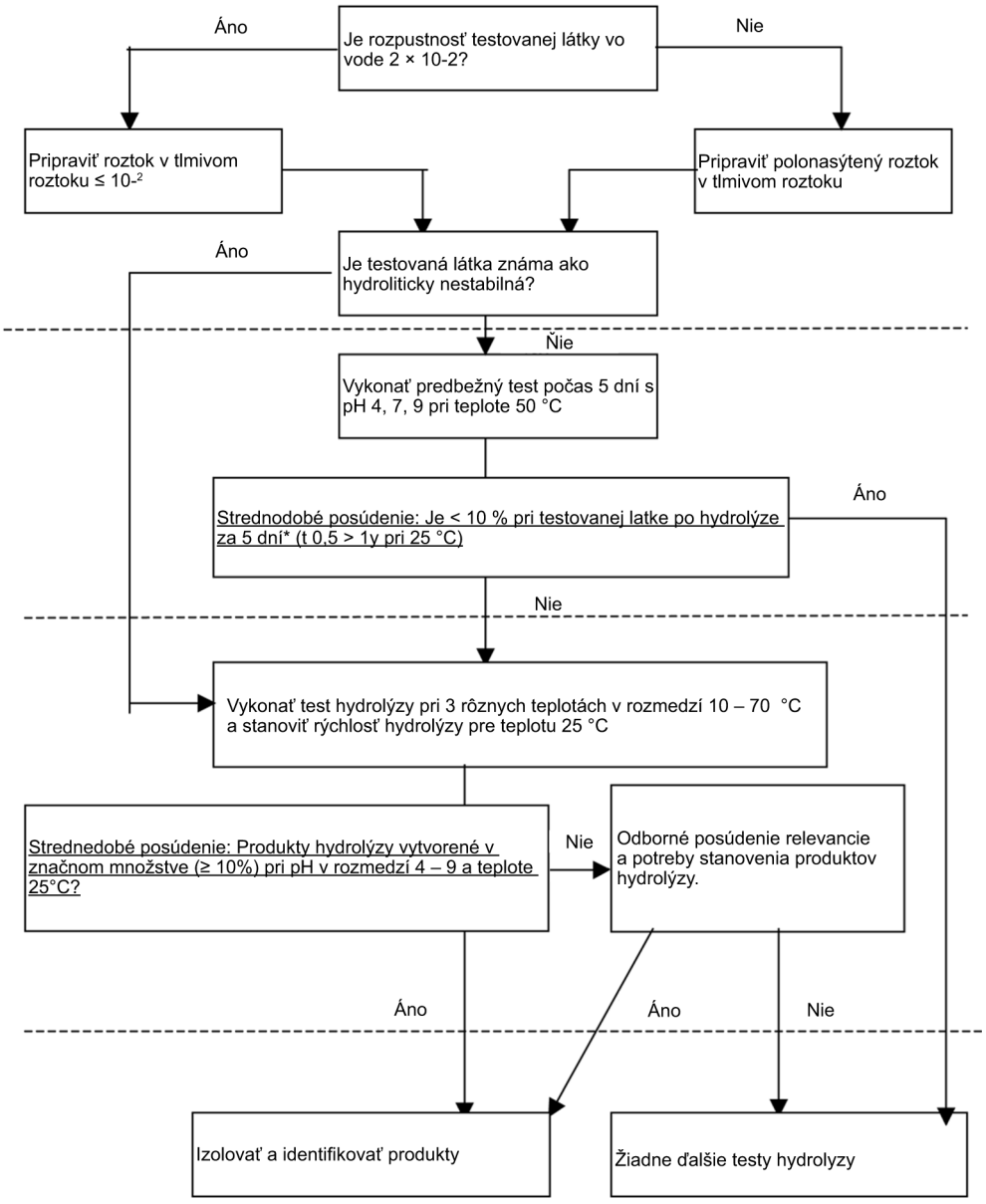
(10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

(11) Mabey, W. and Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383 – 415.

▼B

DODATOK 1

Schéma stupňovitého testu hydrolýzy



* 10 % hydrolýza testovanej látky pri teplote 50 °C zodpovedá polčasu rozpadu v dĺžke približne 30 dní, čo zodpovedá približne 1 roku pri teplote 25 °C.

▼B

PRÍLOHA 2

Vymedzenie pojmov a jednotky

Štandardné medzinárodné (SI) jednotky by sa mali používať v každom prípade.

Testovaná látka: akákoľvek látka, či už materská zlúčenina alebo relevantné produkty transformácie.

Produkty transformácie: všetky látky, ktoré sú výsledkom biotických alebo abiotických transformačných reakcií testovanej látky.

Produkty hydrolýzy: všetky látky, ktoré sú výsledkom hydrolytických transformačných reakcií testovanej látky.

Hydrolýza znamená reakciu testovanej látky RX s vodou, s čistou výmenou skupiny X za skupinu OH v reakčnom jadre:

$$RX + HOH \rightarrow ROH + HX \qquad [1]$$

Rýchlosť, ktorou sa znižuje koncentrácia RX v tomto zjednodušenom procese, je daná týmto vzťahom:

rýchlosť = k $[H_2O]$ [RX] reakcia druhého rádu

alebo

rýchlosť = k [RX] reakcia prvého rádu

v závislosti od rýchlosť určujúceho kroku. Pretože voda je v porovnaní s testovanou látkou prítomná vo veľkej prevahe, tento druh reakcie sa zvyčajne opisuje ako reakcia pseudoprvého rádu, v ktorej je pozorovaná rýchlostná konštanta daná vzťahom

$$k_{obs} = k\,[H_2O] \qquad [2]$$

a možno ju stanoviť z rovnice (*)

$$k_{obs} = \frac{1}{t}\ln\frac{C_o}{C_t} \qquad [3]$$

kde

t = čas

a C_o, C_t = koncentrácia RX v čase 0 a v čase t.

Jednotky tejto konštanty majú rozmery (času)$^{-1}$ a polčasu degradácie reakcie (čas na reakciu 50 % RX) a sú dané vzťahom

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}} \qquad [4]$$

Polčas degradácie: ($t_{0,5}$) je čas potrebný na 50 % hydrolýzu testovanej látky, ak reakciu možno opísať kinetikou prvého rádu: nezávisí od koncentrácie.

(*) Ak grafické znázornenie log-transformovaných údajov oproti času neindikuje lineárnu funkciu (zodpovedajúcu pomeru reakcie prvého rádu), potom nie je použitie rovnice [3] vhodné na stanovenie rýchlostnej konštanty hydrolýzy testovanej zložky.

▼B

DT_{50} (čas úbytku 50): je čas, za ktorý sa koncentrácia testovanej látky zníži o 50 %; je odlišný od polčasu degradácie $t_{0,5}$, ak sa reakcia neriadi kinetikou prvého rádu.

Odhad rýchlostnej konštanty k pri rozdielnych teplotách

Ak sú známe hodnoty rýchlostnej konštanty pri dvoch teplotách, rýchlostnú konštantu pri inej teplote možno vypočítať použitím Arrheniovej rovnice:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ alebo } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Grafické znázornenie ln k proti l/T vykazuje rovnú čiaru so sklonom –E/R,

kde:

k = rýchlostná konštanta zmeraná pri rozličných teplotách,

E = aktivačná energia [kJ/mol],

T = absolútna teplota [K],

R = plynová konštanta [8,314 J/mol.K].

Aktivačná energia sa vypočítala pomocou regresnej analýzy alebo tejto rovnice:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

kde: $T_2 > T_1$.

▼B

DODATOK 3

Tlmivé systémy

A. **CLARK AND LUBS:**

Tlmivé zmesi CLARK a LUBS (*)

Zloženie	pH
0,2 N HCl A 0,2 N KCl pri 20 °C	
47,5 ml HCl + 25 ml KCl zriediť na 100 ml	1,0
32,25 ml HCl + 25 ml KCl zriediť na 100 ml	1,2
20,75 ml HCl + 25 ml KCl zriediť na 100 ml	1,4
13,15 ml HCl + 25 ml KCl zriediť na 100 ml	1,6
8,3 ml HCl + 25 ml KCl zriediť na 100 ml	1,8
5,3 ml HCl + 25 ml KCl zriediť na 100 ml	2,0
3,35 ml HCl + 25 ml KCl zriediť na 100 ml	2,2
0,1 M hydrogénftalán draselný + 0,1 N HCl pri 20 °C	
46,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	2,2
39,60 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	2,4
32,95 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	2,6
26,42 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	2,8
20,32 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	3,0
14,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	3,2
9,90 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	3,4
5,97 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	3,6
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	3,8
0,1 M hydrogénftalán draselný + 0,1 N NaOH pri 20 °C	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	4,2
7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	4,4
12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	4,6
17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	4,8

(*) Hodnoty pH uvedené v týchto tabuľkách sa vypočítali na základe potenciálnych meraní pomocou Sörensenových štandardných rovníc (1909). Zodpovedajúce hodnoty pH sú o 0,04 jednotiek vyššie ako hodnoty v tabuľkách.

▼B

Zloženie	pH
23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	5,0
29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	5,2
35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	5,4
39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	5,6
43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	5,8
45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml hydrogénftalánu do 100 ml	6,0

Tlmivé zmesi CLARK a LUBS (pokračovanie)

0,1 M dihydrogénfosforečnan draselný + 0,1 N NaOH pri 20 °C	
5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	6,0
8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	6,2
12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	6,4
17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	6,6
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	7,2
39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	7,4
42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	7,6
45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	7,8
46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml 100 ml dihydrogénfosforečnanu do 100 ml	8,0
0,1 M H_3BO_3 v 0,1 M KCl + 0,1 N NaOH pri 20 °C	
2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	7,8
3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	8,0
5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	8,2
8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	8,4
12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	8,6
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	9,4
36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	9,6
40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	9,8
43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml kyseliny trihydrogénboritej do 100 ml	10,0

B. **KOLTHOFF A VLEESCHHOUWER:**

Citranové tlmivé roztoky KOLTHOFF a VLEESCHHOUWER

Zloženie	pH
0,1 M citran draselný a 0,1 N HCl pri 18 ºC (*)	
49,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citranu do 100 ml	2,2
43,4 ml 0,1 N HCl + 50 ml citranu do 100 ml	2,4
36,8 ml 0,1 N HCl + 50 ml citranu do 100 ml	2,6
30,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citranu do 100 ml	2,8
23,6 ml 0,1 N HCl + 50 ml citranu do 100 ml	3,0
17,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citranu do 100 ml	3,2
10,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml citranu do 100 ml	3,4
4,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml citranu do 100 ml	3,6
0,10,2 M citran draselný a 0,1 N NaOH pri 18 ºC (*)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	4,2
23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	4,4
31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	4,6
39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	4,8
46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	5,0
54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	5,2
61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	5,4
68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	5,6
74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	5,8
81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml citranu do 100 ml	6,0

(*) Pridajte drobný kryštál tymolu alebo podobnej látky, aby sa zabránilo rastu plesní.

▼B

C. **SÖRENSEN:**

Boritanové zmesi SÖRENSEN

Zloženie		Sörensen 18 °C	Walbum, pH pri		
ml boraxu	ml HCl/NaOH		10 °C	40 °C	70 °C
0,05 M bórax + 0,1 N HCl					
5,25	4,75	7,62	7,64	7,55	7,47
5,50	4,50	7,94	7,98	7,86	7,76
5,75	4,25	8,14	8,17	8,06	7,95
6,00	4,00	8,29	8,32	8,19	8,08
6,50	3,50	8,51	8,54	8,40	8,28
7,00	3,00	8,08	8,72	8,56	8,40
7,50	2,50	8,80	8,84	8,67	8,50
8,00	2,00	8,91	8,96	8,77	8,59
8,50	1,50	9,01	9,06	8,86	8,67
9,00	1,00	9,09	9,14	8,94	8,74
9,50	0,50	9,17	9,22	9,01	8,80
10,00	0,00	9,24	9,30	9,08	8,86
0,05 M bórax + 0,1 N NaOH					
10,0	0,0	9,24	9,30	9,08	8,86
9,0	1,0	9,36	9,42	9,18	8,94
8,0	2,0	9,50	9,57	9,30	9,02
7,0	3,0	9,68	9,76	9,44	9,12
6,0	4,0	9,97	10,06	9,67	9,28

Fosforečnanové zmesi podľa SÖRENSEN

Zloženie	pH
0,0667 M dihydrogénfosforečnan draselný + 0,0667 M hydrogénfosforečnan disodný pri 20 °C	
99,2 ml KH_2PO_4 + 0,8 ml Na_2HPO_4	5,0
98,4 ml KH_2PO_4 + 1,6 ml Na_2HPO_4	5,2
97,3 ml KH_2PO_4 + 2,7 ml Na_2HPO_4	5,4
95,5 ml KH_2PO_4 + 4,5 ml Na_2HPO_4	5,6
92,8 ml KH_2PO_4 + 7,2 ml Na_2HPO_4	5,8
88,9 ml KH_2PO_4 + 11,1 ml Na_2HPO_4	6,0
83,0 ml KH_2PO_4 + 17,0 ml Na_2HPO_4	6,2
75,4 ml KH_2PO_4 + 24,6 ml Na_2HPO_4	6,4
65,3 ml KH_2PO_4 + 34,7 ml Na_2HPO_4	6,6

▼B

53,4 ml KH_2PO_4 + 46,6 ml Na_2HPO_4	6,8
41,3 ml KH_2PO_4 + 58,7 ml Na_2HPO_4	7,0
29,6 ml KH_2PO_4 + 70,4 ml Na_2HPO_4	7,2
19,7 ml KH_2PO_4 + 80,3 ml Na_2HPO_4	7,4
12,8 ml KH_2PO_4 + 87,2 ml Na_2HPO_4	7,6
7,4 ml KH_2PO_4 + 92,6 ml Na_2HPO_4	7,8
3,7 ml KH_2PO_4 + 96,3 ml Na_2HPO_4	8,0

▼B

C.8. **TOXICITA NA DÁŽĎOVKÁCH**

UMELOPÔDNY TEST

1. **METÓDA**

1.1. ÚVOD

V tomto laboratórnom teste sa testovaná látka pridáva do umelej pôdy, v ktorej sú po dobu 14 dní umiestnené dážďovky. Po tomto čase (alternatívne po 7 dňoch) sa zisťuje letálny efekt testovanej látky na dážďovky. Test poskytuje metódu na relatívne krátkodobé sledovanie účinku chemických látok na dážďovky cez príjem pokožkou a tráviacim traktom.

1.2. DEFINÍCIE A JEDNOTKY

LC_{50}: Koncentrácia testovanej látky, ktorá usmrtí 50 % testovacích organizmov počas doby experimentu.

1.3. REFERENČNÁ LÁTKA

Referenčná látka sa periodicky používa na preukázanie, že citlivosť testovacieho systému sa významne nezmenila.

Ako referenčná látka sa odporúča chloroacetamid analytickej čistoty.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Pôda je variabilné médium, a preto sa v tomto teste používa presne definovaná ílovitá umelá pôda. Dospelé dážďovky druhu *Eiseniafoetida* (pozri poznámku v dodatku) sú uchovávané v definovanej umelej pôde v prítomnosti rôznych koncentrácií testovanej látky. Obsah nádoby sa po 14 dňoch (alternatívne po 7 dňoch) od začiatku testu vysype na tácku a pre každú testovanú koncentráciu sa počíta množstvo prežívajúcich dážďoviek

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Test je navrhnutý tak, aby bol v maximálnej miere reprodukovateľný vzhľadom na použitú testovanú látku a organizmus. Mortalita v kontrole nesmie presiahnuť na konci testu 10 %, v opačnom prípadne je test neplatný.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. *Materiál*

1.6.1.1. Testovací substrát

Ako základný substrát je používaná presne definovaná umelá pôda.

a) Základný substrát (percentá sú uvedené pre sušinu)

— 10 % rašeliny (pH čo najbližšie k 5,5 až 6,0, bez viditeľných rastlinných zvyškov a jemne rozdrvená),

▼B

— 20 % kaolínovej hliny s obsahom kaolínu prednostne vyšším ako 50 %,

— približne 69 % priemyselného kremenného piesku (prevažne jemný piesok, kde viac ako 50 % častíc má veľkosť 0,05 až 0,2 mm). Ak látka nie je dostatočne dispergovateľná vo vode, 10 g látky na jednu testovaciu nádobu by malo byť ponechané na dodatočné zmiešanie s testovanou látkou,

— približne 1 % uhličitanu vápenatého ($CaCO_3$), práškový, chemicky čistý, pridávaný na vyrovnanie pH k 6,0 ± 0,5.

b) Testovací substrát

Testovací substrát obsahuje základný substrát, testovanú látku a deionizovanú vodu.

Obsah vody je približne 25 až 42 % sušiny základného substrátu. Obsah vody v substráte sa určuje vysušením vzorky na konštantnú hmotnosť pri teplote 105 °C. Kľúčovým kritériom vlhkosti umelej pôdy je neprítomnosť stojacej vody. Pozorne treba dohliadnuť na rovnomerné premiešanie testovanej látky a substrátu. Spôsob zapracovania testovanej látky do substrátu musí byť uvedený.

c) Kontrolný substrát

Kontrolný substrát obsahuje základný substrát a vodu. Ak je použitá nejaká aditívna látka, dodatočná kontrola by mala obsahovať rovnaké množstvo tejto aditívnej látky.

1.6.1.2. Testovacie nádoby

Testovacími nádobami sú sklenené nádoby s objemom približne 1 liter (primerane zakryté plastovými vrchnákmi, miskami alebo fóliou s vetracími otvormi) naplnené testovacím alebo kontrolným substrátom, ktorý zodpovedá 500 g sušiny substrátu.

1.6.2. *Podmienky testu*

Nádoby by mali byť uskladnené v klimatizovaných miestnostiach pri teplote 20 ± 2 °C a pri stálom osvetlení. Intenzita svetla sa odporúča 400 – 800 luxov.

Doba experimentu je 14 dní, ale mortalita môže byť alternatívne hodnotená po 7 dňoch od začatia testu.

1.6.3. *Postup testu*

Testovacie koncentrácie

Koncentrácie testovanej látky sú vyjadrené ako hmotnosť látky na hmotnosť sušiny základného substrátu (mg/kg).

Test na vyhľadávanie rozsahu

Rozpätie koncentrácií spôsobujúcich mortalitu od 0 do 100 % môže byť stanovené v teste na vyhľadávanie rozsahu, pri ktorom sa získajú informácie o tom, ktoré koncentrácie sa použijú v konečnom teste.

▼B

Látka by mala byť testovaná v nasledovných koncentráciách: 1 000; 100; 10; 1; 0,1 mg látky/kilogram testovacieho substrátu (sušiny).

Ak sa uskutočňuje konečný test v plnom rozsahu, v teste na vyhľadávanie rozsahu by mala byť dostačujúca jedna testovacia skupina na koncentráciu a jedna neovplyvnená kontrola, každá po 10 jedincov.

Konečný test

Výsledky testu na vyhľadávanie rozsahu sa použijú na výber najmenej 5 koncentrácií v geometrickom rade tak, aby pokrývali rozpätie mortality 0 až 100 % a odlišujúcich sa od seba konštantným faktorom nepresahujúcim hodnotu 1,8.

Testy s použitím týchto koncentrácií by mali umožniť čo najpresnejšie stanovenie koncentrácie LC_{50} a jej hranice významnosti.

V konečnom teste sú zahrnuté najmenej 4 testované skupiny na koncentráciu a 4 neovplyvnené kontroly, každá po 10 jedincov. Výsledky v paralelných skupinách sa uvádzajú ako priemer a smerodajná odchýlka.

Ak dve následné koncentrácie v pomere 1,8 dávajú iba 0 a 100 % mortalitu, sú tieto dve hodnoty dostačujúce na indikovanie rozpätia, do ktorého spadá hodnota LC_{50}.

Zmes základného testovacieho substrátu a testovanej látky

Testovací substrát by podľa možnosti mal byť pripravený bez akýchkoľvek prísad iných ako voda. Bezprostredne pred začatím testu sa emulzia alebo disperzia testovanej látky v deionizovanej vode alebo inom rozpúšťadle zmieša so základným testovacím substrátom, alebo je na substrát rovnomerne nastriekaná jemným chromatografickým alebo podobným sprejom.

Ak je testovaná látka nerozpustná vo vode, môže byť rozpustená v čo najmenšom objeme vhodného organického rozpúšťadla (napr. hexán, acetón alebo chloroform).

Na rozpustenie, dispergovanie alebo emulgovanie testovanej látky môžu byť použité len činidlá, ktoré sú ľahko prchavé. Testovací substrát musí byť pred použitím prevzdušnený. Množstvo vyparenej vody treba nahradiť. Kontrola by mala obsahovať rovnaké množstvo akejkoľvek aditívnej látky.

Ak testovaná látka nie je rozpustná, dispergovateľná alebo emulgovateľná v organickom rozpúšťadle, je potrebné zmiešať 10 g zmesi jemne rozdrveného kremenného piesku a testovanej látky v množstve potrebnom na ovplyvnenie 500 g sušiny umelej pôdy so 490 g sušiny testovacieho substrátu.

Pre každú testovaciu skupinu sa do sklenenej nádoby umiestni vlhký testovací substrát v množstve 500 g sušiny a na povrch substrátu sa uloží 10 dážďoviek, ktoré boli 24 hodín pred pokusom vystavené podmienkam podobným vlhkému základnému substrátu a následne umyté a prebytočná voda odsatá filtračným papierom.

▼B

Aby sa zabránilo vysychaniu substrátu, nádoby sú zakryté perforovanými plastovými vrchnákmi, miskami alebo fóliou a v týchto testovacích podmienkach sú uchovávané 14 dní.

Hodnotenie by sa malo uskutočňovať 14 dní (alternatívne 7 dní) po začatí experimentu. Substrát sa rozvrství na sklenenú platňu alebo platňu z nehrdzavejúcej ocele. Pozorujú sa dážďovky a počíta sa množstvo prežívajúcich jedincov. Dážďovka sa považuje za mŕtvu, ak nereaguje na jemný mechanický podnet v prednej časti tela.

Ak sa vyhodnotenie robí na 7. deň, nádoby sa opätovne naplnia substrátom a prežívajúce dážďovky sa umiestnia na povrch toho istého testovacieho substrátu.

1.6.4. *Testovacie organizmy*

Testovacími organizmami sú dospelé jedince druhu *Eisenia foetida* (pozri dodatok) (najmenej 2 mesiace staré s vyvinutým klitelom) s hmotnosťou 300 až 600 mg vo vlhkom stave. (Metóda chovu, pozri dodatok).

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE A VYHODNOTENIE VÝSLEDKOV

Koncentrácie testovanej látky sa vyjadrujú vo vzťahu k príslušným percentám odumretých jedincov.

Ak sú údaje adekvátne, hodnota LC_{50} a hranice významnosti (p = 0,05) sa určujú štandardnými metódami (Litchfield a Wilcoxon, 1949, pre ekvivalentnú metódu). Hodnota LC_{50} sa udáva v mg testovanej látky na kilogram testovacieho substrátu (sušina).

V prípadoch, keď je sklon koncentračnej krivky príliš strmý na prepočet hodnoty LC_{50}, postačuje grafický odhad tejto hodnoty.

Ak dve následné koncentrácie v pomere 1,8, dávajú iba 0 a 100 % mortalitu, sú tieto dve hodnoty dostačujúce na indikovanie rozpätia, do ktorého spadá hodnota LC_{50}.

3. **SPRÁVA**

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu obsahuje podľa možnosti tieto informácie:

— vyhlásenie, že test bol uskutočnený v súlade s vyššie uvedenými kritériami kvality,

— uskutočnený test (test na vyhľadávanie rozsahu a/alebo konečný test),

— presný opis testovacích podmienok a vyhlásenie, že test bol prevedený v súlade s metódou; akákoľvek odchýlka musí byť uvedená,

— presný opis zmiešania testovacej látky so základným substrátom,

— informáciu o testovacích organizmoch (druh, vek, priemer a rozpätie hmotnosti, podmienky udržiavania a chovu, dodávateľ),

▼B

— metódu použitá na určenie hodnoty LC_{50}

— výsledky, vrátane všetkých použitých údajov,

— opis pozorovaných prejavov alebo zmien správania testovacích organizmov,

— mortalita v kontrolách,

— hodnotu LC_{50} alebo najvyššiu testovanú koncentráciu bez mortality a najnižšiu testovanú koncentráciu s mortalitou 100 % 14 dní (alternatívne 7 dní) po začatí experimentu,

— znázornenie koncentračnej krivky/krivky odpovede,

— výsledky získané použitím referenčnej látky, buď v spojení s prezentovaným testom, alebo z predchádzajúcej kontroly kvality.

4. **LITERATÚRA**

(1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 207,* Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) Edwards, C. A. and Lofty, J. R., 1977, *Biology of Earthworms,* Chapman and Hall, London, 331 s.

(3) Bouche, M. B., 1972, *Lombriciens de France, Ecology et Systématique,* Institut National de la Recherche Agronomique, 671 s.

(4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluation dose effect experiments. *J. Pharm. Exp. Therap.,* vol. 96, 1949, s. 99.

(5) Commission of the European Communities, *Development of* a *standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms,* Report EUR 8714 EN, 1983.

(6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt fur Land-and Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in kunstlichem Boden“, in: Rudolph/Boje, *Ókotoxikologie,* ecomed, Landsberg, 1986.

▼B

Dodatok

Chov a udržiavanie dážďoviek pred testom

Na chov dážďoviek sa používa chovná nádoba s čerstvým substrátom, do ktorej sa na 14 dní umiestni 30 až 50 dospelých jedincov. Tieto jedince sa potom môžu použiť na ďalšie chovné sady. Dážďovky vyliahnuté z kokónov sa po dosiahnutí dospelosti používajú na testovanie (pri uvedených podmienkach je to po 2 až 3 mesiacoch).

Podmienky udržiavania a chovu

Klimatizovaná miestnosť:	teplota 20 ± 2 °C, prednostne s kontinuálnym osvetlením (intenzita 400 až 800 luxov),
Chovné nádoby:	primerané plytké nádoby s objemom 10 až 20 litrov.
Substrát:	*Eisenia foetida* sa môže pestovať v rôznych živočíšnych exkrementoch. Ako chovné médium sa doporučuje zmes 50 % rašeliny a 50 % kravského alebo konského hnoja. Médium by malo mať pH približne 6 až 7 (regulované prídavkom uhličitanu vápenatého) a nízku iónovú vodivosť (menej ako 6 mmhos alebo 0,5 % solí).
	Substrát by mal byť vlhký, ale nie príliš mokrý.
	Okrem vyššie uvedenej metódy sa môžu použiť aj iné úspešné postupy.

Poznámka: *Eisenia foetida* sa vyskytuje v dvoch líniách, ktoré niektorí taxonomisti rozdelili do druhov (Bouche, 1972). Sú morfologicky podobné, ale *Eisenia foetida foetida* má typické priečne prúžkovanie na článkoch a *Eisenia foetida andrei* nemá uvedené prúžkovanie a má nepravidelné načervenalé zafarbenie. Podľa možnosti je vhodné použiť dážďovky *Eisenia foetida andrei.* Ak je k dispozícii potrebná metodika, môžu byť použité aj iné druhy.

▼B

C.9. **BIODEGRADÁCIA**

ZAHN-WELLENSOV TEST

1. **METÓDA**

1.1. ÚVOD

Účelom tejto metódy je hodnotenie potenciálnej konečnej biodegradovateľnosti vo vode rozpustných, neprchavých organických látok v stacionárnom teste pri vystavení vysokým koncentráciám mikroorganizmov.

Môže sa vyskytnúť fyzikálno-chemická adsorbcia na suspendované pevné látky, a preto ju treba brať do úvahy pri interpretácii výsledkov (pozri 3.2).

Študované látky sa používajú v koncentráciách zodpovedajúcich hodnotám DOC v rozmedzí 50 až 400 mg/liter alebo hodnotám COD v rozmedzí 100 až 1 000 mg/liter [DOC = dissolved organic carbon (rozpustený organický uhlík); COD = chemical oxygen demand (chemická spotreba kyslíka)]. Takéto relatívne vysoké koncentrácie majú výhodu analytickej spoľahlivosti. Zlúčeniny s toxickými vlastnosťami môžu oddialiť alebo inhibovať degradačný proces.

V tejto metóde sa na zistenie biodegradovateľnosti testovanej látky využíva meranie rozpusteného organického uhlíka a chemická spotreba kyslíka.

Súčasné použitie špecifickej analytickej metódy môže umožniť zhodnotenie primárnej biodegradácie látky (odstránenie pôvodnej chemickej štruktúry).

Metóda je aplikovateľná len na tie testované organické látky, ktoré pri koncentráciách použitých v teste vykazujú nasledujúce vlastnosti:

— sú pri testovacích podmienkach rozpustné vo vode,

— pri testovacích podmienkach majú zanedbateľný tlak pár,

— nepôsobia inhibične na baktérie,

— v testovacom systéme sú adsorbované len v limitovanom množstve,

— z testovacieho roztoku sa nestrácajú penením.

Informácia o relatívnom pomere hlavných zložiek testovaného materiálu sa použije pri interpretácii získaných výsledkov, obzvlášť v prípadoch, kde sú výsledky slabé alebo okrajové.

Informácia o toxicite látky na mikroorganizmy je žiaduca pri interpretácii slabých výsledkov a pri výbere vhodných testovacích koncentrácií.

▼B

1.2. DEFINÍCIE A JEDNOTKY

Stupeň biodegradácie dosiahnutý na konci testu sa udáva ako „Biodegradovateľnosť v Zahn-Wellensovom teste“:

$$D_T\ (\%) = \left[1 - \frac{(C_T - C_B)}{(C_A - C_{BA})}\right] \times 100$$

kde:

DT = biodegradácia (%) v čase T,

CA = DOC (alebo COD) hodnota v testovanej zmesi meraná 3 hodiny po začatí testu (mg/l) (DOC = rozpustený organický uhlík, COD = chemická spotreba kyslíka),

CT = DOC alebo COD hodnota testovanej zmesi v čase odberu vzorky (mg/l),

CB = DOC alebo COD hodnota slepého pokusu v čase odberu vzorky (mg/l),

CBA = DOC alebo COD hodnota slepého pokusu meraná 3 hodiny po začatí testu (mg/l).

Rozsah degradácie sa zaokrúhľuje na najbližšie celé percento.

Percentuálna degradácia sa stanovuje ako percento úbytku DOC (alebo COD) z testovanej látky.

Rozdiely medzi hodnotami nameranými po 3 hodinách od začatia testu a prepočítanými alebo prednostne nameranými počiatočnými hodnotami poskytujú vhodnú informáciu o eliminácii látky (pozri 3.2, Interpretácia výsledkov).

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

V prípade skúmania novej testovanej látky je vhodné použiť referenčnú látku, avšak špecifickú referenčnú látku nie je zatiaľ možné odporučiť.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Aktivovaný kal, minerálne živiny a testovaný materiál ako jediný zdroj uhlíka vo vodnom roztoku sú spolu umiestnené do sklenenej nádoby s objemom 1 až 4 litre vybavenej miešadlom a prevzdušňovačom. Zmes sa premiešava a prevzdušňuje pri teplote 20 až 25 °C pod difúznym osvetlením alebo v tme po dobu 28 dní. Proces degradácie sa monitoruje vo filtrovanom roztoku stanovovaním hodnoty DOC (alebo COD) denne alebo v iných pravidelných časových intervaloch. Pomer eliminovaných DOC (alebo COD) v každom časovom intervale k hodnote získanej po 3 hodinách od začiatku testu sa vyjadruje ako percento biodegradácie a slúži na meranie rozsahu degradácie v danom čase. Výsledok je znázornený v biodegradačnej krivke v závislosti od času.

Pri použití špecifickej analytickej metódy sa môže merať zmena koncentrácie pôvodnej molekuly v dôsledku biodegradácie (primárna biodegradovateľnosť).

▼B

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Dostatočná reprodukovateľnosť tohto testu bola potvrdená kruhovým testom.

Citlivosť metódy je do značnej miery určená variabilitou slepej vzorky a v menšej miere presnosťou stanovenia hodnoty DOC a hladiny testovanej zlúčeniny v médiu.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. *Príprava*

1.6.1.1. Reagenčné látky

Testovacia voda: pitná voda s obsahom organického uhlíka menej ako < 5 mg/liter. Koncentrácia iónov vápnika a horčíka nesmie spolu presiahnuť 2,7 mmol/liter; v opačnom prípade sa požaduje riedenie s deionizovanou alebo destilovanou vodou.

Kyselina sírová, analytickej čistoty (p.a.): 50 g/l

Roztok hydroxidu sodného (p.a.): 40 g/l

Roztok minerálnych živín: rozpustiť v 1 litri deionizovanej vody:

chlorid amónny, NH_4Cl, (p.a.): 38,5 g

dihydrogénfosforečnan sodný, $NaH_2PO_4.2H_2O$, (p.a.): 33,4 g,

dihydrogénfosforečnan draselný, KH_2PO_4, (p.a): 8,5 g,

hydrogénfosforečnan draselný, K_2HPO_4, (p.a.): 21,75 g.

Zmes slúži jednak ako zdroj živín aj ako tlmivý roztok.

1.6.1.2. Prístroje

Sklenené nádoby s objemom 1 až 4 litre (napr. cylindrické nádoby).

Miešadlo so skleneným alebo kovovým rotorom na vhodnom pieste (miešadlo by malo rotovať približne 5 až 10 cm nad dnom nádoby). Namiesto takéhoto miešadla môže byť použitý aj magnetický rotor s miešadlom dlhým 7 až 10 cm.

Sklená trubka s vnútorným priemerom 2 až 4 mm na vháňanie vzduchu. Koniec trubky s otvorom by mal byť približne 1 cm nad dnom nádoby.

Centrifúga (približne 3 550 g).

pH meter.

Prístroj na meranie rozpusteného kyslíka.

Papierové filtre.

▼B

Membránová filtračná aparatúra.

Membránové filtre s pórmi o veľkosti 0,45 μm. Vhodné sú membránové filtre, ktoré neumožňujú únik uhlíka ani absorpciu látky počas filtrácie.

Analytické zariadenie na stanovenie obsahu organického uhlíka a chemickej spotreby kyslíka.

1.6.1.3. Príprava inokula

Aktivovaný kal z biologickej čističky sa premýva (opakovanou) centrifugáciou alebo sedimentovaním s testovacou vodou.

Aktivovaný kal musí byť vo vhodnom stave. Takýto kal je dostupný zo správne pracujúcej čističky odpadových vôd. Aby sa získal čo najväčší počet rôznych druhov bakteriálnych kmeňov, uprednostňuje sa zmiešať inokulá z rôznych zdrojov (napr. rôzne čističky, pôdne extrakty, riečne vody a pod.). Zmes sa spracováva podľa vyššie uvedeného postupu.

Na kontrolu aktivity aktivovaného kalu pozri nižšie „Funkčná kontrola“.

1.6.1.4. Príprava testovacích roztokov

Do testovacej nádoby sa pridá 500 ml testovacej vody, 2,5 ml/liter roztoku minerálnych živín a aktivovaný kal v množstve zodpovedajúcom 0,2 až 1,0 g/liter sušiny v celkovom objeme. Následne sa pridá také množstvo zásobného roztoku testovanej látky, aby výsledná koncentrácia DOC v celkovej zmesi bola 50 až 400 mg/liter. Zodpovedajúce hodnoty COD sú 100 až 1 000 mg/liter. Doplní sa testovacou vodou do celkového objemu 1 ž 4 litre. Voľba celkového objemu závisí od počtu vzoriek, u ktorých stanovujeme DOC alebo COD a od objemu nevyhnutného na analytické postupy.

Bežne môžeme považovať objem 2 litre za dostačujúci. Paralelne s každou testovanou skupinou sa spúšťa kontrolná nádoba (slepý test); obsahuje iba aktivovaný kal a roztok minerálnych živín zarobený s testovacou vodou do celkového objemu rovnakého ako v testovanej skupine.

1.6.2. *Vykonanie testu*

Testovacie nádoby sú premiešavané magnetickými miešadlami alebo skrutkovitou vrtuľou pri difúznom osvetlení alebo v tmavej miestnosti pri teplote 20 až 25 °C. Prevzdušňovanie sa vykonáva stlačeným vzduchom, ktorý je, ak je to nevyhnutné, prečistený cez bavlneno-vlnené sitko a premývaciu fľašu. Musí byť zaručené, že kal sa neusadí a koncentrácia kyslíka nepoklesne pod 2 mg/liter.

Hodnota pH sa musí kontrolovať v pravidelných intervaloch (napr. denne), a ak je to nevyhnutné, upravuje sa na pH 7 – 8.

▼B

Straty spôsobené vyparovaním sa dopĺňajú deionizovanou alebo destilovanou vodou v požadovaných množstvách tesne pred každým odberom vzorky. Vhodným krokom je zaznačiť si hladinu kvapaliny v nádobe pre začatím testu. Po každom odbere vzoriek sa robia nové značky (bez miešania a prevzdušňovania). Prvé vzorky sa vždy odoberajú 3 hodiny po začatí testu, aby sa určila adsorpcia testovaného materiálu aktivovaným kalom.

Následne po eliminácii testovaného materiálu sa denne alebo v iných pravidelných časových intervaloch stanovujú hodnoty DOC alebo COD. Vzorky z testovacích nádob a zo slepého pokusu sa prefiltrujú cez dôkladne premytý papierový filter. Prvých 5 ml testovacieho roztoku sa odstráni. Kal, ktorý sa ťažko filtruje, sa môže ešte predtým odstrániť centrifugáciou 10 minút. DOC a COD hodnoty sa stanovujú duplicitne. Test prebieha 28 dní.

Poznámka: Vzorky, ktoré zostávajú zakalené, sa filtrujú cez membránové filtre. Membránové filtre nesmú prepúšťať alebo adsorbovať žiadny organický materiál.

Kontrola funkčnosti aktivovaného kalu

Na kontrolu funkčnej kapacity aktivovaného kalu beží paralelne s každou testovanou sériou nádoba obsahujúca známu látku. Na tento účel sa najčastejšie využíva dietylénglykol.

Adaptácia

Ak sa analýzy uskutočňujú v relatívne krátkych časových intervaloch (napr. denne), môžeme z degradačnej krivky jasne pozorovať adaptáciu (pozri obrázok 2). Test by preto nemal začínať tesne pred víkendom.

Ak je adaptácia pozorovaná na konci periódy, test môže byť predĺžený, až kým nie je degradácia ukončená.

Poznámka: V prípade, že sú potrebné širšie poznatky o správaní sa adaptovaného kalu, aktivovaný kal je opätovne vystavený rovnakému testovanému materiálu podľa nasledujúceho postupu:

Vypne sa miešadlo a prevzdušňovač a nechá sa usadiť aktivovaný kal. Odčerpá sa supernatant a nádoba sa naplní opäť 2 litrami testovacej vody. Mieša sa 15 minút a znovu sa nechá usadiť. Po opätovnom odčerpaní supernatantu sa zvyšný kal použije na opakovanie testu s tým istým testovaným materiálom podľa 1.6.1.4 a 1.6.2. Aktivovaný kal možno izolovať okrem usadzovania aj centrifugáciou.

Adaptovaný kal sa môže zmiešať s čerstvým kalom do koncentrácie 0,2 až 1 g sušiny/liter.

▼B

Analytické prostriedky

Bežne sa vzorky filtrujú cez dôkladne premyté papierové filtre (na premývanie sa používa deionizovaná voda).

Vzorky, ktoré zostávajú zakalené, sa filtrujú cez membránové filtre (0,45 um).

Hodnoty DOC sa vo filtrátoch zo vzoriek stanovujú duplicitne (prvých 5 ml sa odstráni) prostredníctvom TOC zariadenia. Ak filtrát nie je možné analyzovať v ten istý deň, musí sa uskladňovať v chladničke do ďalšieho dňa. Dlhšie skladovanie sa neodporúča.

Koncentrácie COD sa stanovujú vo filtrátoch zo vzoriek COD analýzou postupom uvedeným v literatúre pod bodom (2).

2. **ÚDAJE A HODNOTENIE**

DOC a/alebo COD koncentrácie sa stanovujú zo vzorky najmenej duplicitne podľa uvedeného odseku 1.6.2. Degradácia v čase T sa prepočíta podľa vzorca (s definíciami) uvedeného v odseku 1.2.

Miera degradácie sa zaokrúhľuje na najbližšie celé percento. Množstvo degradácie dosiahnuté na konci testu sa vyjadruje ako „Biodegradovateľnosť v Zahn -Wellensovom teste“.

Poznámka: Ak sa dosiahne úplná degradácia ešte pred koncom testu a tento výsledok sa potvrdí aj druhou analýzou nasledujúci deň, test môže byť uzavretý.

3. **SPRÁVA**

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu obsahuje podľa možnosti nasledujúce informácie:

— počiatočnú koncentráciu testovanej látky,

— všetky ostatné informácie a výsledky experimentov týkajúcich sa testovanej látky, referenčnej látky, ak bola použitá, a slepého pokusu,

— koncentráciu po 3 hodinách,

— biodegradačnú krivku s opisom,

— dátum a miesto, odkiaľ boli testovacie organizmy odobraté, stav adaptácie, použité koncentrácie a pod.,

— vedecké zdôvodnenie akejkoľvek zmeny testovacieho procesu.

3.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Úbytok DOC (COD), ktorý sa vyskytuje postupne v priebehu dní alebo týždňov, naznačuje, že látka je biodegradovaná.

▼B

V niektorých prípadoch však môže hrať úlohu fyzikálno-chemická adsorpcia a táto je indikovaná, ak sa vyskytne úplný alebo čiastočný úbytok do prvých troch hodín od začiatku testu a ak rozdiel medzi kontrolným a testovaným supernatantom zostáva na nečakane nízkej úrovni.

Ak rozdiely spadajú medzi biodegradáciu (alebo parciálnu biodegradáciu) a adsorpciu, sú nevyhnutné ďalšie testy.

Toto sa môže uskutočniť rôznymi spôsobmi, ale najpresvedčivejšie je použitie supernatantu alebo kalu ako inokula v základnom teste (prednostne respirometrický test).

Testovaná látka, ktorá vykazuje vysoký, neadsorpčný úbytok DOC (COD) v tomto teste, sa môže považovať za potenciálne biodegradovateľnú. Čiastočný, neadsorpčný úbytok naznačuje, že látka je predmetom aspoň čiastkovej biodegradácie. Nízky alebo nulový úbytok DOC (COD) môže byť zapríčinený inhibíciou mikroorganizmov testovanou látkou, čo možno tiež spozorovať lýzou alebo stratou kalu za vzniku kalných supernatantov. Test treba v týchto prípadoch zopakovať použitím nižších koncentrácií testovanej látky.

Použitie zložkovo špecifickej analytickej metódy alebo 14C-značenej testovanej látky môže zabezpečiť vyššiu citlivosť. V prípade použitia 14C-značenej testovanej zložky potvrdzuje prítomnosť biodegradácie objavenie $14CO_2$.

Ak sa výsledky uvádzajú vo forme primárnej biodegradácie, treba podľa možnosti priložiť vysvetlenie zmeny chemickej štruktúry, ktorá vedie k strate reakcie pôvodnej testovanej látky.

Platnosť analytickej metódy sa musí uviesť spolu s reakciou zistenou v testovacom médiu v slepom pokuse.

4. LITERATÚRA

(1) OECD, Paris, 1981, *Test Guideline 302 B,* Decision of the Council C(81) 30 final.

(2) Annex V C.9 Degradation: Chemical Oxygen Demand, Commission Directive 84/449/EEC (OJ L 251, 19.9.1984, p. 1).

▼B

Dodatok

PRÍKLAD VYHODNOTENIA

Organická zložka:	kyselina 4-etoxybenzoová
Teoretická testovaná koncentrácia:	600 mg/l
Teoretická hodnota DOC:	390 mg/l
Inokulum:	čistička odpadových vôd z ...
Koncentrácia:	1 g sušiny/liter
Stav adaptácie:	neadaptovaný
Analýza:	stanovenie DOC
Množstvo vzorky:	3ml
Kontrolná látka:	dietylénglykol
Toxicita zložky:	žiadny toxický efekt pod 1 000 mg/l Použitý test: Skúmavkový test fermentácie tabuľka

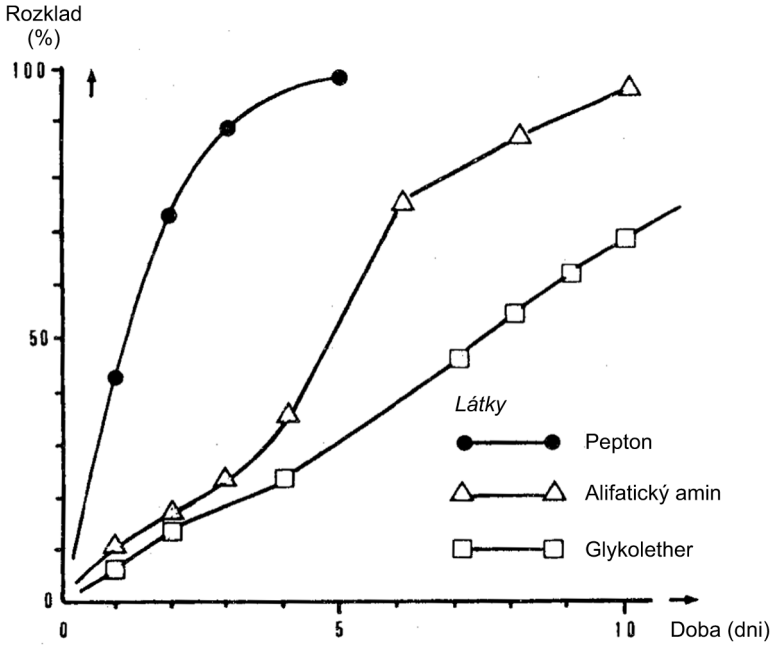
Doba testu	Kontrolná látka				Testovaná látka		
	Slepý pokus DOC ([1]) (mg/liter)	DOC ([1]) (mg/liter)	DOC Čistý (mg/liter)	% degradáde	DOC ([1]) (mg/liter)	DOC Čistý (mg/liter	% degradáde
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 hodiny	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,2	6
1 deň	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 dni	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 dní	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 dní	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 dní	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 dní	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 dní	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 dní	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

([1]) Stredná hodnota troch stanovení DOC.

▼B

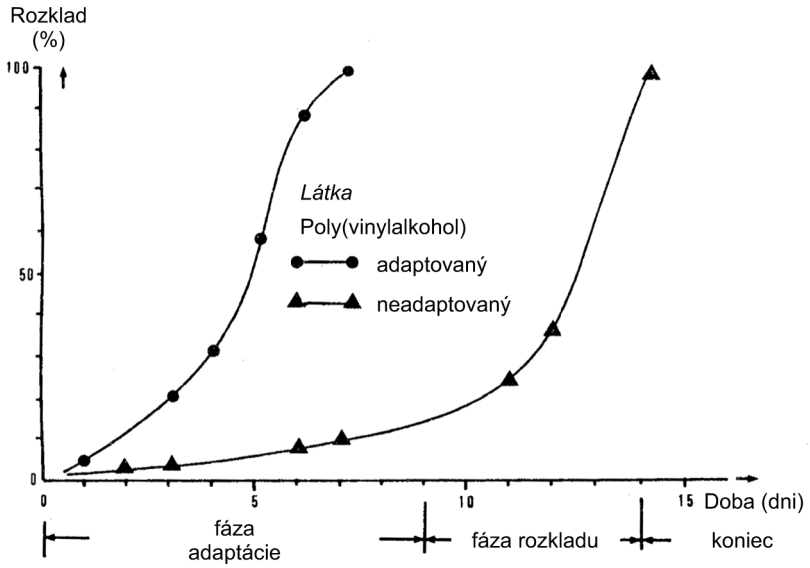
Obrázok č. 1

Príklady biodegradačných kriviek



Obrázok č. 2

Príklady adaptácie kalu



▼M4

C.10. **SIMULAČNÝ TEST AERÓBNEHO ČISTENIA ODPADOVÝCH VÔD C.10-A: JEDNOTKY S TECHNOLÓGIOU AKTIVOVANÉHO KALU – C.10-B: BIOFILMY**

C.10-A: Jednotky s technológiou aktivovaného kalu

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s Usmerneniami OECD na vykonávanie testov (TG) 303 (2001). V 50. rokoch 20. storočia sa zistilo, že novozavedené povrchovo aktívne činidlá spôsobujú v čistiarňach odpadových vôd a v riekach nadmerné penenie. Aeróbnym čistením sa neodstránili úplne a v niektorých prípadoch bránili odstráneniu iných organických materiálov. Tento problém podnietil mnohé výskumy zaoberajúce sa otázkou, ako možno z odpadových vôd odstrániť povrchovo aktívne činidlá a či možno nové chemikálie, ktoré priemysel produkuje, prispôsobiť čisteniu odpadových vôd. Na tento účel sa použili modelové jednotky dvoch hlavných druhov aeróbneho biologického čistenia odpadových vôd (aktivovaný kal a filtrácia perkoláciou alebo prekvapkávaním). Bolo by nepraktické a finančne veľmi náročné distribuovať každú novú chemikáliu a monitorovať veľké čistiarne odpadových vôd, aj keby to bolo len na lokálnej úrovni.

ÚVODNÉ ÚVAHY

Jednotky s technológiou aktivovaného kalu

2. Modelové jednotky s technológiou aktivovaného kalu sú opísané v rozmedzí veľkosti od 300 ml približne do 2 000 ml. Niektoré jednotky v mnohom pripomínali skutočné čistiarne tým, že mali nádrže na usadzovanie kalu, z ktorých sa usadený kal prečerpával späť do prevzdušňovacej nádrže, zatiaľ čo iné jednotky nemali vybavenie na usadzovanie, napr. Swisher (1). Veľkosť zariadenia je výsledkom kompromisu. Na jednej strane musí byť dostatočne veľké na zabezpečenie funkčnej mechanickej prevádzky a dostatočného množstva vzoriek bez toho, aby to ovplyvnilo prevádzku, a na druhej strane by nemalo byť také veľké, aby vyžadovalo nadmerný priestor a materiál.

3. Dvomi druhmi zariadenia s rozsiahlym a vyhovujúcim použitím sú jednotky Husmann (2) a jednotky s pórovitou nádobou (3) (4), ktoré sa prvýkrát použili vo výskume povrchovo aktívnych činidiel. Tieto zariadenia sú opísané v tejto testovacej metóde. Uspokojivé využitie mali aj iné zariadenia, napr. Eckenfelder (5). Vzhľadom na pomerne vysokú finančnú náročnosť a úsilie pri aplikovaní tohto simulačného testu boli súbežne skúmané jednoduchšie a lacnejšie skríningové testy, ktoré sú teraz začlenené do kapitoly C.4 A – F tejto prílohy (6). Zo skúseností s mnohými povrchovo aktívnymi činidlami a inými chemikáliami vyplynulo, že tie, ktoré prešli skríningovými testmi (ľahko biodegradovateľné), sa rozložili aj v simulačnom teste. Niektoré chemikálie, ktoré neprešli skríningovými testmi, prešli testmi inherentnej biodegradovateľnosti [kapitoly C.12 (7) a C.19 (8) tejto prílohy], ale iba niektoré z nich sa rozložili v simulačnom teste, zatiaľ čo chemikálie, ktoré neprešli testmi inherentnej biodegradovateľnosti, sa v simulačných testoch nerozložili (9) (10) (11).

4. Na niektoré účely postačujú simulačné testy uskutočnené s využitím jedného súboru prevádzkových podmienok. Výsledky sú vyjadrené ako percentuálna eliminácia testovanej chemikálie alebo rozpusteného organického uhlíka (DOC). Opis takéhoto testu je uvedený v tejto testovacej metóde. Na rozdiel od predchádzajúcej verzie tejto kapitoly, v ktorej bol opísaný iba jeden druh zariadenia na čistenie syntetických médií cez spojenie s využitím

▼M4

pomerne hrubej metódy odstraňovania kalu, tento text ponúka viacero možností. Sú tu opísané alternatívne druhy zariadení, prevádzkové režimy a spôsoby odstraňovania odpadovej vody a kalu. Tento text je v súlade s normou ISO 11733 (12), ktorá bola počas prípravy predmetom dôkladnej kontroly, aj keď nebola podrobená kruhovému testu.

5. Na iné účely je nevyhnutné poznať koncentráciu testovanej chemikálie vo výtoku s väčšou presnosťou, a je teda potrebná rozsiahlejšia metóda. Napríklad rýchlosť odstraňovania kalu sa musí presnejšie kontrolovať počas každého dňa a počas trvania testu a čistiarne musia fungovať pri niekoľkých rýchlostiach odstraňovania. V rámci plne komplexnej metódy by testy takisto mali prebiehať pri dvoch alebo troch rôznych teplotách: takúto metódu opisuje Birch (13) (14) a je zhrnutá v dodatku 6. Súčasné znalosti však nepostačujú na rozhodnutie o tom, ktoré kinetické modely sú použiteľné na biodegradáciu chemikálií pri čistení odpadových vôd a vo vodnom prostredí všeobecne. Použitie Monodovej kinetiky, uvedené v dodatku 6 ako príklad, je obmedzené na chemikálie prítomné v koncentrácii 1 mg/l a viac, ale podľa niektorých názorov aj to ešte treba podložiť dôkazmi. Testy pri koncentráciách, ktoré reálnejšie odrážajú hodnoty namerané v odpadových vodách, sa uvádzajú v dodatku 7, ale tieto testy spolu s testami v dodatku 6 sú zahrnuté do dodatkov a nie sú publikované ako samostatné testovacie metódy.

Filtre

6. Modelom perkolačných filtrov bola venovaná oveľa menšia pozornosť možno preto, lebo sú ťažšie ovládateľné a menej kompaktné ako modely jednotiek s technológiou aktivovaného kalu. Gerike a kol. vyvinul jednotky s technológiou prekvapkávacích filtrov a prevádzkoval ich s využitím spojenia (15). Tieto filtre boli pomerne veľké (výška 2 m, objem 60 l) a každý vyžadoval 2 l/h odpadovej vody. Baumann a kol. (16) simuloval prekvapkávacie filtre tak, že vložil polyesterové vlnené pásy do trubíc dlhých 1 m (vnútorný priemer 14 mm) po tom, ako boli pásy na 30 minút ponorené do koncentrovaného aktivovaného kalu. Testovaná chemikália ako jediný zdroj C v roztoku minerálnych solí bola napustená vertikálnou trubicou a biodegradácia sa vyhodnotila na základe meraní DOC vo výtoku a CO_2 vo vychádzajúcom plyne.

7. Biofiltre boli simulované inak (15). Vnútorné povrchy rotujúcich trubíc, ktoré boli pod malým uhlom naklonené k horizontálnym, boli napustené odpadovou vodou (približne 250 ml/h) s testovanou chemikáliou a bez nej, pričom v odobraných výtokoch sa analyzovala prítomnosť DOC a/alebo konkrétnej testovanej chemikálie.

PRINCÍP TESTU

8. Táto metóda bola vypracovaná s cieľom stanoviť elimináciu a primárnu a/alebo úplnú biodegradáciu organických chemikálií rozpustných vo vode pomocou aeróbnych mikroorganizmov v testovacom systéme s nepretržitou prevádzkou, ktorý simuluje proces aktivovaného kalu. Ľahko biodegradovateľné organické médium a organická testovaná chemikália sú pre mikroorganizmy zdrojom uhlíka a energie.

9. Dve testovacie jednotky s nepretržitou prevádzkou (čistiarne s technológiou aktivovaného kalu alebo pórovité nádoby) sú v prevádzke súbežne za rovnakých podmienok, ktoré sa vyberú tak, aby vyhovovali účelu testu. Priemerný hydraulický retenčný čas je zvyčajne 6 h a priemerný vek kalu (retenčný čas kalu) je šesť až desať dní. Kal sa odstraňuje jednou alebo dvoma metódami, testovaná chemikália sa zvyčajne pridá v koncentrácii medzi 10 mg/l rozpusteného organického uhlíka (DOC) a 20 mg/l DOC do prítoku (organické médium) iba jednej z jednotiek. Druhá jednotka sa použije ako kontrolná jednotka s cieľom stanoviť biodegradáciu organického média.

▼M4

10. V často odoberaných vzorkách výtokov sa špecifickou analýzou podľa možnosti určí DOC alebo chemická spotreba kyslíka (COD) spolu s koncentráciou testovanej chemikálie (ak sa požaduje) vo výtoku z jednotky, do ktorej sa pridáva testovaná chemikália. Predpokladá sa, že rozdiel medzi koncentráciami DOC alebo COD vo výtoku medzi testovacími a kontrolnými jednotkami vzniká v dôsledku testovanej chemikálie alebo jej organických metabolitov. Tento rozdiel sa porovná s koncentráciou DOC alebo COD v prítoku v dôsledku pridanej testovanej chemikálie s cieľom určiť elimináciu testovanej chemikálie.

11. Biodegradáciu je možné zvyčajne odlíšiť od bioadsorpcie tak, že sa dôkladne preskúma krivka závislosti eliminácie chemikálie od času, a zvyčajne ju možno potvrdiť pomocou testu ľahkej biodegradovateľnosti s použitím aklimatizovaného inokula z jednotky, do ktorej sa pridáva testovaná chemikália.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

12. Je potrebné poznať čistotu, rozpustnosť vo vode, prchavosť a adsorpčné vlastnosti testovanej chemikálie, aby bolo možné správne interpretovať výsledky. Prchavé a nerozpustné chemikálie sa zvyčajne nemôžu testovať, pokiaľ sa neprijmú zvláštne opatrenia (pozri dodatok 5). Je nutné poznať aj chemickú štruktúru alebo aspoň empirický vzorec, aby bolo možné vypočítať teoretické hodnoty a/alebo skontrolovať namerané hodnoty parametrov, napr. teoretická spotreba kyslíka (ThOD), rozpustený organický uhlík (DOC) a chemická spotreba kyslíka (COD).

13. Informácie týkajúce sa toxicity testovanej chemikálie pre mikroorganizmy (pozri dodatok 4) môžu byť užitočné pri výbere vhodných testovaných koncentrácií a môžu byť nevyhnutné pre správnu interpretáciu nízkych hodnôt biodegradácie.

ÚROVNE ÚSPEŠNOSTI

14. Pri pôvodnom použití tohto simulačného (potvrdzujúceho) testu primárnej biodegradácie povrchovo aktívnych činidiel sa požaduje odstránenie viac ako 80 % špecifickej chemikálie pred tým, ako sa povrchovo aktívne činidlo môže uviesť na trh. Ak sa nedosiahne hodnota 80 %, môže sa použiť tento simulačný (potvrdzujúci) test a povrchovo aktívne činidlo možno uviesť na trh, iba ak sa odstráni viac ako 90 % špecifickej chemikálie. Pri chemikáliách vo všeobecnosti nevzniká otázka úspešného/neúspešného hodnotenia v teste a získaná hodnota percentuálnej eliminácie sa môže použiť v približných výpočtoch pravdepodobnej koncentrácie v životnom prostredí, ktoré sa použijú v hodnotení rizika predstavovaného chemikáliami. Výsledky sa zvyčajne riadia schémou „všetko alebo nič“. V mnohých štúdiách čistých chemikálií sa zistilo, že percentuálna eliminácia DOC je > 90 % v prípade viac ako troch štvrtín chemikálií a > 80 % pri vyše 90 % chemikálií, ktoré vykazovali významný stupeň biodegradovateľnosti.

15. V odpadových vodách je prítomných pomerne málo chemikálií (napr. povrchovo aktívnych činidiel) v koncentráciách (približne 10 mg C/l) použitých v tomto teste. Niektoré chemikálie môžu mať pri týchto koncentráciách inhibičný účinok, zatiaľ čo kinetika eliminácie iných chemikálií sa pri nízkych koncentráciách môže líšiť. Presnejšie hodnotenie degradácie možno uskutočniť prostredníctvom upravených metód s využitím realisticky nízkych koncentrácií testovanej chemikálie a zozbierané údaje možno použiť na výpočet kinetických konštánt. Potrebné experimentálne postupy však ešte nie sú celkom overené a nie sú stanovené ani kinetické modely, ktoré opisujú biodegradačné reakcie (pozri dodatok 7).

▼M4

REFERENČNÉ CHEMIKÁLIE

16. S cieľom zabezpečiť správne vykonanie experimentálneho postupu je užitočné súbežne so skúmaním testovaných chemikálií príležitostne testovať aj chemikálie, ktorých správanie je známe. Medzi také chemikálie patrí kyselina adipová, 2-fenylfenol, 1-naftol, kyselina 2,2-bifenyldikarboxylová, kyselina 1-naftoová atď. (9) (10) (11).

REPRODUKOVATEĽNOSŤ VÝSLEDKOV TESTU

17. Existuje podstatne menej správ o štúdiách simulačných testov ako správ o štúdiách testov ľahkej biodegradovateľnosti. Reprodukovateľnosť medzi (súbežnými) opakovaniami testu je dobrá (v rozsahu 10 – 15 %) v prípade testovaných chemikálií rozložených na 80 % alebo viac, ale v prípade horšie rozložiteľných chemikálií je variabilita väčšia. Pri niektorých hraničných chemikáliách boli takisto pri rôznych príležitostiach počas deviatich týždňov povolených v teste zaznamenané veľmi rôznorodé výsledky (napr. 10 %, 90 %).

18. Medzi výsledkami získanými pomocou dvoch druhov zariadení boli zistené malé rozdiely, ale niektoré chemikálie sa rozložili vo väčšej miere a konzistentnejšie v prítomnosti domácich splaškových vôd ako v syntetických médiách OECD.

OPIS TESTOVACEJ METÓDY

Zariadenie

Testovací systém

19. Testovací systém pre jednu testovanú chemikáliu pozostáva z testovacej jednotky a z kontrolnej jednotky. Ak sa však vykonávajú iba špecifické analýzy (primárna biodegradácia), vyžaduje sa len testovacia jednotka. Jedna kontrolná jednotka sa môže použiť pre viaceré testovacie jednotky, do ktorých sa pridávajú rovnaké alebo rôzne testované chemikálie. V prípade spájania (dodatok 3) musí mať každá testovacia jednotka svoju vlastnú kontrolnú jednotku. Testovacím systémom môže byť buď model čistiarne s technológiou aktivovaného kalu, jednotka Husmann (dodatok 1, obrázok 1), alebo pórovitá nádoba (dodatok 1, obrázok 2). V oboch prípadoch sú potrebné dostatočne veľké zásobné nádoby pre prítoky a výtoky, ako aj pumpy na dávkovanie prítoku buď zmiešaného s roztokom testovanej chemikálie, alebo dodaného samostatne.

20. Každá jednotka čistiarne s technológiou aktivovaného kalu sa skladá z prevzdušňovacej nádoby so známou kapacitou približne tri litre aktivovaného kalu a separátora (sekundárny čerič), ktorý pojme približne 1,5 litra. Objemy možno do určitej miery meniť nastavením výšky separátora. Nádoby rôznych veľkostí sú prípustné, ak sa prevádzkujú pri porovnateľných hydraulických záťažiach. Ak nie je možné udržať teplotu v testovacej miestnosti v želanom rozsahu, odporúča sa použiť nádoby s vodným plášťom s kontrolou teploty vody. Na nepretržitú alebo v pravidelných intervaloch prerušovanú recykláciu aktivovaného kalu zo separátora do prevzdušňovacej nádoby sa používa vzduchové alebo dávkovacie čerpadlo.

21. Systém pórovitej nádoby sa skladá z vnútorného pórovitého valca s kónickým dnom umiestneného v o niečo väčšej nádobe rovnakého tvaru, ktorá je však vyrobená z nepriepustného plastového materiálu. Vhodným materiálom pre pórovitú nádobu je pórovitý polyetylén s maximálnou veľkosťou pórov 90 µm a s hrúbkou 2 mm. Separácia kalu z ošetreného organického média sa uskutočňuje diferenciálnym prechodom cez pórovitú stenu. Výtok sa zhromažďuje v prstencovom priestore, odkiaľ preteká do zbernej nádoby. Nedochádza k usadzovaniu, a teda ani k obnove kalu. Celý

▼M4

systém môže byť upevnený vo vodnou kúpeli s termostatickou kontrolou. Pórovité nádoby sa môžu upchať a pretekať do počiatočných fáz. V takom prípade je potrebné vymeniť pórovitú vložku za čistú tak, že sa odčerpá kal z nádoby do čistého vedra a odstráni sa upchatá vložka. Po očistení nepriepustného vonkajšieho valca sa vloží čistá vložka a kal sa vráti späť do nádoby. Všetok kal, ktorý sa zachytil po stranách upchatej vložky, sa takisto dôkladne zotrie a prenesie. Upchaté nádoby sa najskôr vyčistia jemným prúdom vody, ktorým sa odstráni zostávajúci kal, a namočia do zriedeného roztoku chlórnanu sodného, potom do vody a následne sa dôkladne opláchnu vodou.

22. Na prevzdušňovanie kalu v prevzdušňovacích nádobách obidvoch systémov sú nevyhnutné vhodné metódy, napríklad sintrované frity (difúzne kamene) a stlačený vzduch. V prípade potreby sa musí vzduch čistiť cez vhodný filter a premývať. Do systému sa musí vháňať dostatok vzduchu s cieľom zachovať aeróbne podmienky a udržať vločky kalu v suspenznom stave počas celého trvania testu.

Filtračné zariadenie alebo odstredivka

23. Prístroj na filtráciu vzoriek s membránovými filtrami vhodnej pórovitosti (nominálny priemer otvoru 0,45 μm), ktoré adsorbujú rozpustné organické chemikálie a uvoľňujú organický uhlík v minimálnej miere. Ak sa použijú filtre, ktoré uvoľňujú organický uhlík, je potrebné dôkladne umyť filtre horúcou vodou, aby sa odstránil vylúhovateľný organický uhlík. Prípadne sa môže použiť odstredivka schopná dosiahnuť 40 000 m/s^2.

Analytické zariadenie

24. Prístroj schopný určiť:

— DOC (rozpustený organický uhlík) a TOC (celkový organický uhlík) alebo COD (chemická spotreba kyslíka),

— špecifickú chemikáliu v prípade potreby,

— suspendované tuhé látky, pH, koncentráciu kyslíka vo vode,

— teplotu, kyslosť a zásaditosť,

— amónium, dusitan a dusičnan, ak sa test vykonáva v nitrifikačných podmienkach.

Voda

25. Voda z vodovodu s obsahom DOC nižším ako 3 mg/l. Určí sa zásaditosť, ak ešte nie je známa.

26. Deionizovaná voda s obsahom DOC nižším ako 2 mg/l.

Organické médium

27. Ako organické médium sú prípustné syntetické médiá, domáce splaškové vody alebo zmes obidvoch. Ukázalo sa (11) (14), že pri použití samotných domácich splaškových vôd často dochádza k zvýšenej percentuálnej eliminácii DOC a dokonca je možná eliminácia a biodegradácia niektorých chemikálií, ktoré nepodliehajú biodegradácii pri použití syntetických médií OECD. Nepretržitým alebo prerušovaným pridávaním domácich splaškových vôd sa takisto často stabilizuje aktivovaný kal vrátane rozhodujúcej schopnosti dobrého usadzovania sa. Preto sa odporúča používať domáce splaškové vody. Meria sa koncentrácia DOC alebo COD v každej novej dávke organického média. Je potrebné poznať kyslosť alebo zásaditosť organického média. Organické médium môže vyžadovať pridanie vhodného tlmivého roztoku (hydrogénuhličitan sodný alebo dihydrogénfosforečnan draselný), ak má nízku kyslosť alebo zásaditosť, aby počas testu v prevzdušňovacej nádobe ostalo zachované pH s hodnotou približne 7,5 ± 0,5. O množstve a čase pridania tlmivého roztoku sa rozhoduje individuálne pre každý prípad. Ak sa používajú zmesi, či už nepretržite alebo prerušovane, DOC (alebo COD) v zmesi sa musí udržiavať na približne stálych hodnotách, napríklad riedením vodou.

▼M4

Syntetické médiá

28. V každom litri vody z vodovodu sa rozpustí: 160 mg peptónu, 110 mg mäsového extraktu, 30 mg močoviny, 28 mg bezvodého hydrogénfosforečnanu draselného (K_2HPO_4), 7 mg chloridu sodného (NaCl), 4 mg dihydrátu chloridu vápenatého ($CaCl_2.2H_2O$), 2 mg heptahydrátu síranu horečnatého ($Mg_2SO_4.7H_20$). Toto syntetické médium OECD je uvedené ako príklad a zabezpečuje strednú koncentráciu DOC v prítoku v hodnote približne 100 mg/l. Môžu sa prípadne použiť iné zloženia s približne rovnakou koncentráciou DOC, ktoré sa viac približujú skutočným splaškovým vodám. Ak je potrebný prítok s nižšou koncentráciou, zriedia sa syntetické médiá napríklad v pomere 1: 1 s vodou z vodovodu, aby sa získala koncentrácia približne 50 mg/l. Takýto slabší prítok umožní lepší rast nitrifikačných organizmov, pričom táto modifikácia by sa mala použiť v prípade skúmania simulácie nitrifikačných čistiarní odpadových vôd. Tieto syntetické médiá sa môžu pripraviť v destilovanej vode v koncentrovanej forme a do jedného týždňa skladovať pri teplote približne 1 °C. V prípade potreby sa zriedia vodou z vodovodu. (Toto médium nie je vyhovujúce, napr. koncentrácia dusíka je veľmi vysoká, pomerne nízky obsah uhlíka, ale nebolo navrhnuté nič lepšie okrem pridania ďalšieho fosfátu ako tlmivého roztoku a ďalšieho peptónu).

Domáce splaškové vody

29. Použijú sa čerstvo usadené splaškové vody zbierané denne z čistiarní odpadových vôd, do ktorých sa dodávajú prevažne domáce splaškové vody. Mali by sa odobrať pred primárnou sedimentáciou z prietokového kanála nádrže primárnej sedimentácie alebo z prívodu do čistiarne s technológiou aktivovaného kalu a mali by byť zbavené hrubých častíc. Splaškové vody sa môžu použiť po niekoľkodňovom uskladnení (ktoré by však vo všeobecnosti nemalo presiahnuť sedem dní) pri teplote približne 4 °C, ak sa preukáže, že DOC (alebo COD) sa výrazne neznížil (t. j. o menej ako 20 %). Na obmedzenie porúch systému je potrebné pred použitím upraviť DOC (alebo COD) každej novej dávky na vhodnú stálu hodnotu, napr. zriedením vodou z vodovodu.

Aktivovaný kal

30. Odoberie sa aktivovaný kal na inokuláciu z prevzdušňovacej nádrže správne prevádzkovanej čistiarne odpadových vôd alebo z laboratórnej jednotky s technológiou aktivovaného kalu spracúvajúcej prevažne domáce splaškové vody.

Zásobné roztoky testovanej chemikálie

31. V prípade chemikálií s dostatočnou rozpustnosťou sa pripravia zásobné roztoky s vhodnými koncentráciami (napr. 1 – 5 g/l) v deionizovanej vode alebo v minerálnej časti syntetických médií (pre nerozpustné a prchavé chemikálie pozri dodatok 5). Určí sa DOC a celkový organický uhlík (TOC) zásobného roztoku a merania sa opakujú pri každej novej dávke. Ak je rozdiel medzi DOC a TOC väčší ako 20 %, je potrebné skontrolovať rozpustnosť testovanej chemikálie vo vode. Porovná sa DOC alebo koncentrácia testovanej chemikálie nameraná špecifickou analýzou zásobného roztoku a nominálna hodnota, aby sa zistilo, či je výťažnosť dostatočná (zvyčajne možno očakávať > 90 %). Je potrebné sa uistiť, najmä pri disperziách, či sa DOC môže alebo nemôže použiť ako analytický parameter alebo či sa môže použiť iba analytická metóda špecifická pre testovanú chemikáliu. Pri disperziách sa vyžaduje odstredenie vzoriek. Pri každej novej dávke sa odmeria DOC, COD alebo testovaná chemikália pomocou špecifickej analýzy.

▼M4

32. Určí sa pH zásobného roztoku. Z krajných hodnôt vyplýva, že pridanie chemikálie môže vplývať na pH aktivovaného kalu v testovacom systéme. V takom prípade je potrebné neutralizovať zásobný roztok na získanie pH 7 ± 0,5 pomocou malých množstiev anorganickej kyseliny alebo zásady, ale treba zabrániť zrážaniu testovanej chemikálie.

POSTUP

33. Opísaný postup je určený pre čistiarne s technológiou aktivovaného kalu. Pre systém pórovitej nádoby je potrebné ho mierne prispôsobiť.

Príprava inokula

34. Na začiatku testu sa testovací systém inokuluje buď s aktivovaným kalom, alebo inokulom obsahujúcim nízku koncentráciu mikroorganizmov. Inokulum je potrebné udržiavať prevzdušnené pri izbovej teplote až do jeho použitia a použiť ho do 24 hodín. V prvom prípade sa zoberie vzorka aktivovaného kalu z prevzdušňovacej nádrže účinne prevádzkovanej biologickej čistiarne odpadových vôd alebo z laboratórnej čistiarne, do ktorej sa dodávajú prevažne domáce splaškové vody. Ak sa simulujú nitrifikačné podmienky, kal sa odoberie z nitrifikačnej čistiarne odpadových vôd. Určí sa koncentrácia suspendovaných tuhých látok a v prípade potreby sa kal koncentruje usadením tak, aby bol objem pridaný do testovacieho systému čo najmenší. Je nutné zabezpečiť, aby bola počiatočná koncentrácia suchej hmoty približne 2,5 g/l.

35. V druhom prípade sa ako inokulum použije 2 – 10 ml/l výtoku z biologickej čistiarne domácich odpadových vôd. Na získanie čo najväčšieho počtu rôznych druhov baktérií môže byť užitočné pridať inokulá z viacerých iných zdrojov, napríklad z povrchovej vody. V takom prípade v testovacom systéme vznikne a pribudne aktivovaný kal.

Dávkovanie organického média

36. Zabezpečí sa, aby boli prítokové a výtokové nádoby a potrubia z prítokových nádob a do výtokových nádob dôkladne očistené, aby sa eliminovalo množenie mikróbov na začiatku a počas trvania testu. Testovacie systémy sa sústredia v miestnosti s kontrolovanou teplotou (zvyčajne v rozsahu 20 – 25 °C) alebo sa použijú testovacie jednotky s vodným plášťom. Pripraví sa dostatočný objem požadovaného organického média (odseky 27– 29). Najskôr sa prevzdušňovacia nádoba a separátor naplnia organickým médiom a pridá sa inokulum (odseky 34, 35). Začne sa s prevzdušňovaním tak, aby sa kal udržiaval v suspenzii a v aeróbnom stave, a následne sa začne s dávkovaním prítoku a recykláciou usadeného kalu. Organické médium sa dávkuje zo skladovacích nádob do prevzdušňovacích nádob (odseky 20, 21) testovacích a kontrolných jednotiek, pričom príslušné výtoky sa odoberú do podobných skladovacích nádob. S cieľom dosiahnuť bežný hydraulický retenčný čas 6 h sa organické médium prečerpáva rýchlosťou 0,5 l/h. Na účely potvrdenia tejto rýchlosti sa denné množstvo dávkovaného organického média odmeria tak, že sa zaznamená zníženie objemov média v skladovacích nádobách. Na zistenie účinkov prerušovaného vypúšťania a „šokového“ pridávania chemikálií by boli potrebné iné spôsoby dávkovania.

37. Ak sa organické médium pripravuje na použitie na obdobie dlhšie ako jeden deň, je potrebné chladenie pri teplote približne 4 °C alebo iné vhodné metódy konzervácie, aby sa predišlo množeniu mikróbov a biodegradácii mimo testovacích jednotiek (odsek 29). Ak sa použijú syntetické médiá, môže sa pripraviť a pri teplote približne 4 °C uskladniť koncentrovaný zásobný roztok (napr. desaťnásobok bežnej koncentrácie, odsek 28). Tento zásobný roztok možno pred použitím dôkladne zmiešať s primeraným množstvom vody z vodovodu, prípadne ho možno prečerpávať priamo, kým sa zvlášť prečerpáva primerané množstvo vody z vodovodu.

▼M4

Dávkovanie testovanej chemikálie

38. Primerané množstvo zásobného roztoku testovanej chemikálie (odsek 31) sa pridá do skladovacej nádoby prítoku alebo sa samostatnou pumpou dávkuje priamo do prevzdušňovacej nádoby. Bežná priemerná testovacia koncentrácia v prítoku by mala byť medzi 10 mg/l a 20 mg/l DOC s hornou koncentráciou nie vyššou ako 50 mg/l. Ak je testovaná chemikália slabo rozpustná vo vode alebo ak sú pravdepodobné toxické účinky, je potrebné znížiť koncentráciu na 5 mg/l DOC alebo aj menej, ale len v prípade, že je k dispozícii a vykoná sa vhodná špecifická analytická metóda (rozptýlené testované chemikálie, ktoré sú slabo rozpustné vo vode, sa môžu pridať s využitím špeciálnych dávkovacích metód, pozri dodatok 5).

39. Testovaná chemikália sa začne pridávať po uplynutí intervalu, v ktorom sa systém stabilizoval a účinne odstraňuje DOC organického média (približne 80 %). Pred pridaním testovanej chemikálie je dôležité skontrolovať, či všetky jednotky pracujú rovnako účinne. Ak to tak nie je, zvyčajne pomáha zmiešať jednotlivé kaly a do jednotlivých jednotiek znovu rozdeliť rovnaké objemy. Ak sa použije inokulum (približne) 2,5 g/l (suchá hmotnosť) aktivovaného kalu, testovaná chemikália sa môže pridávať od začiatku testu, lebo priame pridávanie zvyšujúcich sa množstiev od začiatku má tú výhodu, že aktivovaný kal môže byť schopný lepšie sa prispôsobiť testovanej chemikálii. Pri ktoromkoľvek spôsobe pridávania testovanej chemikálie sa odporúča v pravidelných intervaloch merať príslušnú rýchlosť prietoku a/alebo objemy v skladovacej nádobe (nádobách).

Manipulácia s aktivovaným kalom

40. Koncentrácia tuhých látok v aktivovanom kale sa zvyčajne v priebehu testu nezávisle od použitého inokula stabilizuje medzi limitmi v rozsahu 1 – 3 g/l (suchá hmotnosť) v závislosti od kvality a koncentrácie organického média, prevádzkových podmienok, charakteru prítomných mikroorganizmov a vplyvu testovanej chemikálie.

41. Buď sa určia suspendované tuhé látky v prevzdušňovacej nádobe aspoň raz týždenne a odoberie sa prebytočný kal s cieľom udržať koncentráciu na úrovni 1 – 3 g/l (suchá hmotnosť), alebo sa pri stálej hodnote kontroluje stredný vek kalu, zvyčajne v rozmedzí šesť až desať dní. Ak sa napríklad zvolí retenčný čas kalu v trvaní ôsmich dní, denne je potrebné odstrániť 1/8 objemu aktivovaného kalu v prevzdušňovacej nádobe a zlikvidovať ho. Tento postup sa vykonáva každý deň alebo podľa možnosti prostredníctvom automatickej prerušovane prevádzkovanej pumpy. Udržiavaním konštantnej koncentrácie suspendovaných tuhých látok alebo jej udržiavaním v rámci úzkych limitov sa nezachováva stály retenčný čas kalu (SRT), ktorý je prevádzkovou premennou podmieňujúcou hodnotu koncentrácie testovanej chemikálie vo výtoku.

42. Počas trvania testu sa aspoň raz denne odstráni všetok kal, ktorý sa zachytáva na stenách prevzdušňovacej nádoby a separátora, aby sa resuspendoval. Je potrebné pravidelne kontrolovať a čistiť všetky trubice a potrubia, aby sa predišlo rastu biofilmu. Usadený kal zo separátora sa recykluje do prevzdušňovacej nádoby podľa možnosti prerušovaným prečerpávaním. V systéme pórovitej nádoby nedochádza k recyklovaniu, ale je nutné zabezpečiť vloženie čistých vnútorných nádob, skôr než objem v nádobe výrazne stúpne (odsek 21).

43. V čistiarňach Husmann môže dochádzať k slabému usadzovaniu a strate kalu. To možno napraviť súbežným použitím jedného alebo viacerých krokov uvedených ďalej v testovacích aj kontrolných jednotkách:

— v pravidelných intervaloch, napr. raz týždenne, sa môže pridávať čerstvý kal alebo flokulačné činidlo (napríklad 2 ml/na nádobu 50 g/l $FeCl_3$), ale je potrebné sa uistiť, či nedochádza k žiadnej reakcii s $FeCl_3$ ani ku zrážaniu testovanej chemikálie,

▼M4

— vzduchové čerpadlo sa môže nahradiť peristaltickým čerpadlom, čím sa umožní približne rovnaký recirkulačný prietok kalu ako prítokový prietok, ktorý je potrebné použiť, a umožní sa vytvorenie anaeróbnej zóny v usadenom kale (geometria vzduchového čerpadla obmedzuje minimálny prietok navráteného kalu na približne 12-násobok prítokového prietoku),

— kal sa môže prečerpávať zo separátora do prevzdušňovacej nádoby prerušovane (napr. 5 min. každú 2,5 h s cieľom recyklovať 1 – 1,5 l/h,

— môže sa použiť netoxické protipeniace činidlo v minimálnej koncentrácii, aby sa predišlo strate v dôsledku penenia (napr. silikónový olej),

— do kalu v separátore sa môže v krátkych šokových dávkach púšťať vzduch (napr. 10 sekúnd každú hodinu),

— do prevzdušňovacej nádoby sa môže v intervaloch dávkovať organické médium (napr. 3 – 10 min. každú hodinu).

Odber vzoriek a analýza

44. V pravidelných intervaloch je potrebné merať koncentráciu rozpusteného kyslíka, teplotu a hodnotu pH aktivovaného kalu v prevzdušňovacích nádobách. Treba zabezpečiť, aby bol nepretržite k dispozícii dostatok kyslíka (> 2 mg/l) a aby bola teplota udržiavaná v požadovanom rozmedzí (zvyčajne 20 – 25 °C). Hodnota pH sa udržiava na úrovni 7,5 ± 0,5 pomocou dávkovania malých množstiev anorganickej zásady alebo kyseliny do prevzdušňovacej nádoby alebo do prítoku alebo pomocou zvyšovania tlmivej kapacity organického média (pozri odsek 27). Pri nitrifikácii dochádza k tvorbe kyseliny, pričom oxidácia 1 mg N vytvára približne 7 mg CO_3^-. Frekvencia meraní závisí od meraného parametra a od stability systému a môže byť rôzna medzi dennými a týždennými meraniami.

45. Odmeria sa DOC alebo COD v prítokoch do kontrolných a testovacích nádob. Koncentráciu testovanej chemikálie je potrebné odmerať v testovacom prítoku špecifickou analýzou alebo ju odhadnúť z koncentrácie v zásobnom roztoku (odsek 31), použitého objemu a množstva splaškových vôd dávkovaných do testovacej jednotky. Odporúča sa vypočítať koncentráciu testovanej chemikálie, aby sa znížila variabilita údajov týkajúcich sa koncentrácie.

46. Z odobratého výtoku sa zoberú vhodné vzorky (napr. 24-hodinové kompozity) a filtrujú sa cez membránu s veľkosťou pórov 0,45 μm alebo sa odstreďujú rýchlosťou približne 40 000 m/s^2 asi 15 min. Odstreďovanie by sa malo použiť, ak je filtrovanie zložité. Určí sa DOC alebo COD aspoň v dvoch vyhodnoteniach s cieľom zmerať konečnú biodegradáciu a v prípade potreby primárnu biodegradáciu analýzou špecifickou pre testovanú chemikáliu.

47. Použitie COD môže pri nízkych koncentráciách viesť k vzniku analytických problémov, preto sa odporúča iba pri použití dostatočne vysokej testovacej koncentrácie (približne 30 mg/l). Pri silne adsorbujúcich chemikáliách sa takisto odporúča merať množstvo adsorbovanej chemikálie v kale pomocou analytickej metódy špecifickej pre testovanú chemikáliu.

48. Frekvencia odoberania vzoriek závisí od očakávanej dĺžky testu. Odporúčaná frekvencia je trikrát týždenne. Keď sú jednotky v účinnej prevádzke, po zavedení testovanej chemikálie sa umožní ich adaptácia počas jedného až maximálne šiestich týždňov, aby dosiahli stabilný stav. Na vyhodnotenie výsledku testu je potrebné získať aspoň 15 platných hodnôt v rovnovážnej fáze (odsek 59), ktorá zvyčajne trvá tri týždne. Test sa môže ukončiť, ak sa dosiahne dostatočný stupeň eliminácie (napr. > 90 %) a ak je k dispozícii týchto 15 hodnôt, ktoré predstavujú analýzy vykonávané každý pracovný deň počas troch týždňov. Po pridaní testovanej chemikálie by test zvyčajne nemal trvať dlhšie ako 12 týždňov.

▼M4

49. Ak kal nitrifikuje a ak sa skúmajú účinky testovanej chemikálie na nitrifikáciu, aspoň raz týždenne sa analyzuje vzorka výtoku z testovacích a kontrolných jednotiek s cieľom zistiť, či neobsahuje amónium a/alebo dusitan a dusičnan.

50. Všetky analýzy by sa mali vykonať čo najskôr, najmä stanovenie dusíka. Ak sa analýzy musia odložiť, vzorky sa uskladnia v tme pri teplote približne 4 °C v plných, pevne uzavretých fľašiach. Ak musia byť vzorky uskladnené viac ako 48 hodín, zakonzervujú sa hlbokým zmrazením, acidifikáciou (napr. 10 ml/l z 400 g/l roztoku kyseliny sírovej) alebo pridaním vhodnej toxickej látky (napr. 20 ml/l z 10 g/l roztoku chloridu ortutnatého). Je potrebné zabezpečiť, aby metóda konzervácie neovplyvnila výsledky analýzy.

Spájanie testovacích jednotiek

51. Ak sa použije spájanie (dodatok 3), denne sa vymení rovnaké množstvo aktivovaného kalu (150 ml za 1 500 ml v prípade prevzdušňovacích nádob s obsahom troch litrov tekutiny) medzi prevzdušňovacími nádobami testovacej jednotky a jej kontrolnej jednotky. Ak testovaná látka silno adsorbuje na kale, vymení sa iba supernatant zo separátorov. V obidvoch prípadoch sa na výpočet výsledkov testu použije faktor korekcie (odsek 55).

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

52. Vypočíta sa percentuálna eliminácia DOC alebo COD testovanej chemikálie pre každé časované hodnotenie pomocou rovnice:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_o)}{C_s} \times 100$$

kde

D_t = % eliminácie DOC alebo COD v čase t,

C_s = DOC alebo COD v prítoku v dôsledku testovanej chemikálie, podľa možnosti odhadnuté zo zásobného roztoku (mg/l),

E = nameraná hodnota DOC alebo COD v testovacom výtoku v čase t (mg/l),

E_o = nameraná hodnota DOC alebo COD v kontrolnom výtoku v čase t (mg/l).

53. Stupeň eliminácie DOC alebo COD organického média v kontrolnej jednotke je informácia užitočná pri hodnotení biodegradačnej činnosti aktivovaného kalu počas testu. Vypočíta sa percentuálna eliminácia z rovnice:

$$D_B = \frac{C_M - E_o}{C_M} \times 100$$

kde

D_B = % eliminácia DOC alebo COD organického média v kontrolnej jednotke v čase t,

C_M = DOC alebo COD organického média v kontrolnom prítoku (mg/l).

▼M4

Môže sa zvoliť aj vypočítanie percentuálnej eliminácie DOC alebo COD v dôsledku organického média a testovanej chemikálie v testovacej jednotke z rovnice:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

kde

D_T = % eliminácie celkového testovacieho prítoku DOC alebo COD,

C_T = DOC alebo COD celkového testovacieho prítoku alebo vypočítané zo zásobných roztokov (mg/l).

54. Vypočíta sa eliminácia testovanej chemikálie, ak je meraná špecifickou analytickou metódou, pri každom časovom hodnotení z rovnice:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

kde

D_{ST} = % primárnej eliminácie testovanej chemikálie v čase t,

S_i = nameraná alebo odhadnutá koncentrácia testovanej chemikálie v testovacom prítoku (mg/l),

S_e = nameraná koncentrácia testovanej chemikálie v testovacom výtoku v čase t (mg/l).

55. Ak sa použilo spájanie, zriedenie testovanej chemikálie v prevzdušňovacej nádobe výmenou kalu sa kompenzuje pomocou faktoru korekcie (pozri dodatok 3). Ak sa použil stredný hydraulický retenčný čas 6 h a výmena polovice objemu aktivovaného kalu v prevzdušňovacej nádobe, stanovené denné hodnoty eliminácie (D_t, odsek 52) sa musia opraviť, aby sa získal skutočný stupeň eliminácie, D_{tc}, testovanej chemikálie z rovnice:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Vyjadrenie výsledkov testu

56. Zakreslí sa percentuálna eliminácia D_t (alebo D_{tc}) a D_{st}, ak je k dispozícii, v závislosti od času (pozri dodatok 2). Z tvaru krivky eliminácie testovanej chemikálie (*per se* alebo ako DOC) možno vyvodiť niekoľko záverov o procese odstraňovania.

Adsorpcia

57. Ak sa od začiatku testu pozoruje vysoká eliminácia DOC testovanej chemikálie, testovaná chemikália je pravdepodobne eliminovaná adsorpciou na tuhých látkach aktivovaného kalu. Je možné to dokázať určením adsorbovanej testovanej chemikálie pomocou špecifickej analýzy. Eliminácia DOC adsorbovateľných chemikálií zvyčajne neostáva vysoká počas celého testu. Bežne sa na začiatku vyskytne vysoký stupeň eliminácie, ktorý postupne klesá na rovnovážnu hodnotu. Ak by však adsorbovateľná testovaná chemikália nejakým spôsobom bola schopná spôsobiť aklimatizáciu populácie mikróbov, eliminácia DOC testovanej chemikálie by následne stúpla a dosiahla by hornú rovnovážnu hodnotu.

▼M4

Lag fáza

58. Podobne ako pri statických skríningových testoch si mnohé testované chemikálie vyžadujú pred úplnou biodegradáciou lag fázu. Počas lag fázy prebieha aklimatizácia alebo adaptácia degradačných baktérií pri takmer nulovej eliminácii testovanej chemikálie. Potom nastane počiatočné množenie týchto baktérií. Táto fáza sa končí a degradačná fáza sa začína, keď sa odstráni približne 10 % počiatočného množstva testovanej chemikálie (po umožnení adsorpcie, ak k nej dochádza). Lag fáza je často veľmi variabilná a slabo reprodukovateľná.

Rovnovážna fáza

59. Rovnovážna fáza krivky eliminácie v nepretržitom teste je vymedzená ako fáza, v ktorej nastáva maximálna degradácia. Rovnovážna fáza by mala trvať najmenej tri týždne a mala by mať približne 15 nameraných platných hodnôt.

Stredný stupeň eliminácie testovanej chemikálie

60. Vypočíta sa stredná hodnota z hodnôt eliminácie (D_t) testovanej chemikálie počas rovnovážnej fázy. Hodnota zaokrúhlená na celé číslo (1 %) predstavuje stupeň eliminácie testovanej chemikálie. Odporúča sa aj vypočítať 95 % interval spoľahlivosti strednej hodnoty.

Eliminácia organického média

61. Zakreslí sa percentuálna eliminácia DOC alebo COD organického média v kontrolnej jednotke (D_B) v závislosti od času. Stredný stupeň eliminácie sa označí rovnakým spôsobom ako v prípade testovanej chemikálie (odsek 60).

Indikácia biodegradácie

62. Ak testovaná chemikália výrazne neadsorbuje na aktivovanom kale a krivka eliminácie má typický tvar biodegradačnej krivky s lag, degradačnou a rovnovážnou fázou (odseky 58, 59), nameraná eliminácia sa môže s istotou pripísať biodegradácii. Ak bola počiatočná eliminácia vysoká, simulačný test nemôže rozlišovať medzi biologickými a abiotickými eliminačnými procesmi. V takých prípadoch a v prípade akýchkoľvek pochybností o biodegradácii (napr. ak dochádza k stripovaniu) sa vykoná analýza adsorbovanej testovanej chemikálie alebo ďalšie statické biodegradačné testy založené na parametroch, ktoré jednoznačne indikujú biologické procesy. Takými testmi sú metódy absorpcie kyslíka [kapitola C.4 D, E a F tejto prílohy (6)] alebo test s meraním tvorby oxidu uhličitého [kapitola C.4 C tejto prílohy (6)] alebo ISO metóda uzavretého priestoru nad kvapalinou (18) s použitím predexponovaného inokula zo simulačného testu. Ak sa odmerala eliminácia DOC aj eliminácia špecifickej chemikálie, výrazné rozdiely (v prípade prvej hodnoty nižšej ako druhej) medzi percentuálnou elimináciou indikujú prítomnosť organických medziproduktov vo výtokoch, ktoré sa môžu rozkladať ťažšie ako materská chemikália.

Platnosť výsledkov testu

63. Informácie o bežnom biodegradačnom správaní inokula sa získajú, ak sa určí stupeň eliminácie organického média (odsek 53) v kontrolnej jednotke. Test možno považovať za platný, ak po dvoch týždňoch stupeň eliminácie DOC alebo COD v kontrolnej jednotke (jednotkách) je > 80 % a nie sú pozorované žiadne nezvyčajné javy.

▼M4

64. Ak sa použila ľahko biodegradovateľná (referenčná) chemikália, stupeň biodegradácie (D_t, odsek 52) by mal byť > 90 %.

65. Ak sa test vykonáva v nitrifikačných podmienkach, stredná koncentrácia vo výtokoch by mala byť < 1 mg/l amoniaku-N a < 2 mg/l dusitanu-N.

66. Ak neboli splnené tieto kritériá (odseky 63 – 65), je potrebné opakovať test s použitím inokula z iného zdroja, testovať referenčnú chemikáliu a skontrolovať testovacie postupy.

Správa o teste

67. Správa o teste musí obsahovať:

Testovaná chemikália:

— identifikačné údaje,

— fyzikálny charakter a pokiaľ je to relevantné významné fyzikálno-chemické vlastnosti.

Podmienky testovania:

— druh testovacieho systému, všetky modifikácie pri testovaní nerozpustných a prchavých chemikálií,

— druh organického média,

— podiel a charakter priemyselných odpadových vôd prítomných v splaškových vodách, ak je známy,

— inokulum: charakter a miesto odberu, koncentrácia a jeho predpríprava,

— zásobný roztok testovanej chemikálie: obsah DOC a TOC, spôsob prípravy v prípade suspendovania, použitá testovacia koncentrácia, odôvodnenie v prípade hodnôt mimo rozsahu 10 – 20 mg/l DOC, metóda pridávania, dátum prvého pridania, všetky zmeny,

— stredný vek kalu a stredný hydraulický retenčný čas, metóda odstraňovania kalu, metódy na zamedzenie zväčšovaniu objemu, úbytok kalu atď.,

— použité analytické metódy,

— teplota počas testu,

— kvalita zväčšovania objemu kalu, objemový index kalu (SVI), suspendované tuhé látky v zmiešanej tekutine (MLSS),

— všetky odchýlky od štandardných postupov a všetky okolnosti, ktoré mohli ovplyvniť výsledky.

Výsledky testu:

— všetky namerané údaje (DOC, COD, špecifické analýzy, pH, teplota, koncentrácia kyslíka, suspendované tuhé látky, N chemikálie v prípade potreby,

— všetky vypočítané hodnoty D_t (alebo D_{tc}), D_B, D_{St} v tabuľkovej podobe a krivky eliminácie,

— informácie o lag a rovnovážnej fáze, trvanie testu, stupeň eliminácie testovanej chemikálie a organického média v kontrolnej jednotke spolu so štatistickými informáciami a vyjadreniami biodegradovateľnosti a platnosti testu,

— rozbor výsledkov.

▼**M4**

LITERATÚRA

1. Swisher, R. D. (1987). Surfactant Biodegradation, druhé vydanie. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 s
2. Nemecká vláda (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt. 1 No. 49: 698 – 706.
3. Painter, H. A., a King, E. F. (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No. 70, Water Research Centre, Medmenham, UK.
4. Painter, H. A. a King, E. F. (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909 – 915.
5. Eckenfelder, W. W. (19) US EPA.
6. Kapitola C.4 tejto prílohy, Stanovenie „ľahkej“ biodegradovateľnosti.
7. Kapitola C.12 tejto prílohy, Biodegradácia – upravený test SCAS.
8. Kapitola C.19 tejto prílohy, Odhad adsorpčného koeficientu (K_{OC}) na pôde a kale z odpadových vôd pomocou vysokoúčinnej kvapalinovej chromatografie (HPLC).
9. Gerike, P., a Fischer, W. K. (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157 – 173.
10. Gerike, P., a Fischer, W. K. (1981), ako (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45 – 55.
11. Painter, H. A., a Bealing, D. (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp 113 – 138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen B. N., Muntau H., Angeletti G.
12. ISO 11733 (1995; revidované 2004). Stanovenie eliminácie a biodegradability organických zlúčenín vo vodnom prostredí. Simulačná skúška s aktivovaným kalom.
13. Birch, R. R. (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol. Deterg.: 33 – 48.
14. Birch, R. R. (1984). Biodegradation of noniomic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340 – 343.
15. Gerike, P., Fischer, W. K., a Holtmann, W. (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat.Res. 14: 753 – 758.
16. Baumann, U., Kuhn, G., a Benz, M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214 – 220.
17. Her Majesty’s Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. s. 91 – 98 ISBN 011 751661 9.
18. ISO 14593 (1998) Kvalita vody. Hodnotenie úplnej aeróbnej biodegradability organických látok vo vodnom prostredí. Metóda analýzy uvoľneného anorganického uhlíka v uzavretých nádobách (skúška CO_2 headspace).

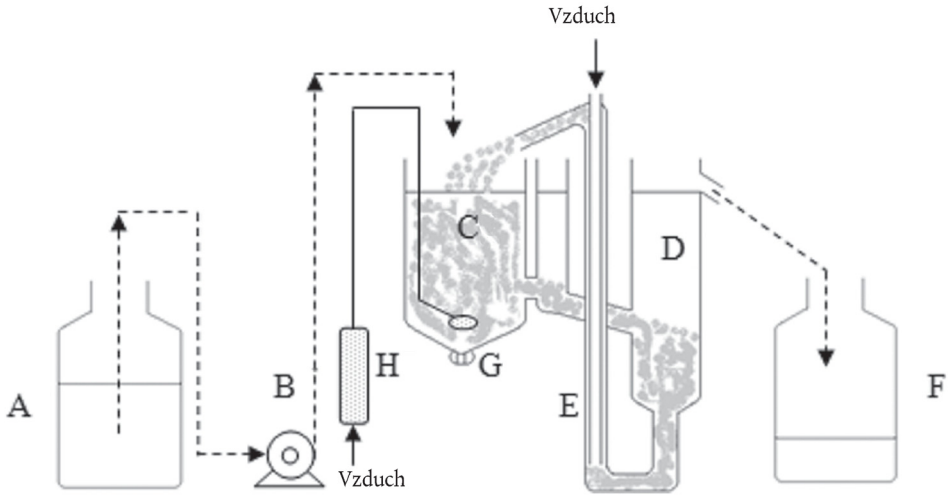
▼**M4**

Dodatok 1

Obrázok 1

Zariadenie používané na hodnotenie biodegradovateľnosti

Jednotka Husmann



A. Zásobná nádoba

B. Dávkovacie čerpadlo

C. Prevzdušňovacia komora (kapacita 31)

D. Usadzovacia nádrž

E. Vzduchové čerpadlo

F. Zberná nádoba

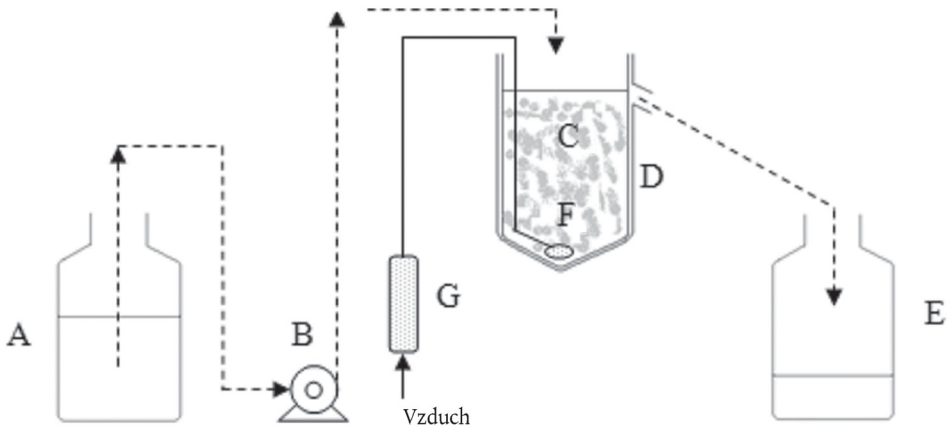
G. Prevzdušňovač

H. Vzduchový prietokomer

Obrázok 2

Zariadenie používané na hodnotenie biodegradovateľnosti

Pórovitá nádoba



A. Zásobná nádoba

B. Dávkovacie čerpadlo

C. Pórovitá prevzdušňovacia nádoba

D. Vonkajšia nepriepustná nádoba

E. Zberná nádoba

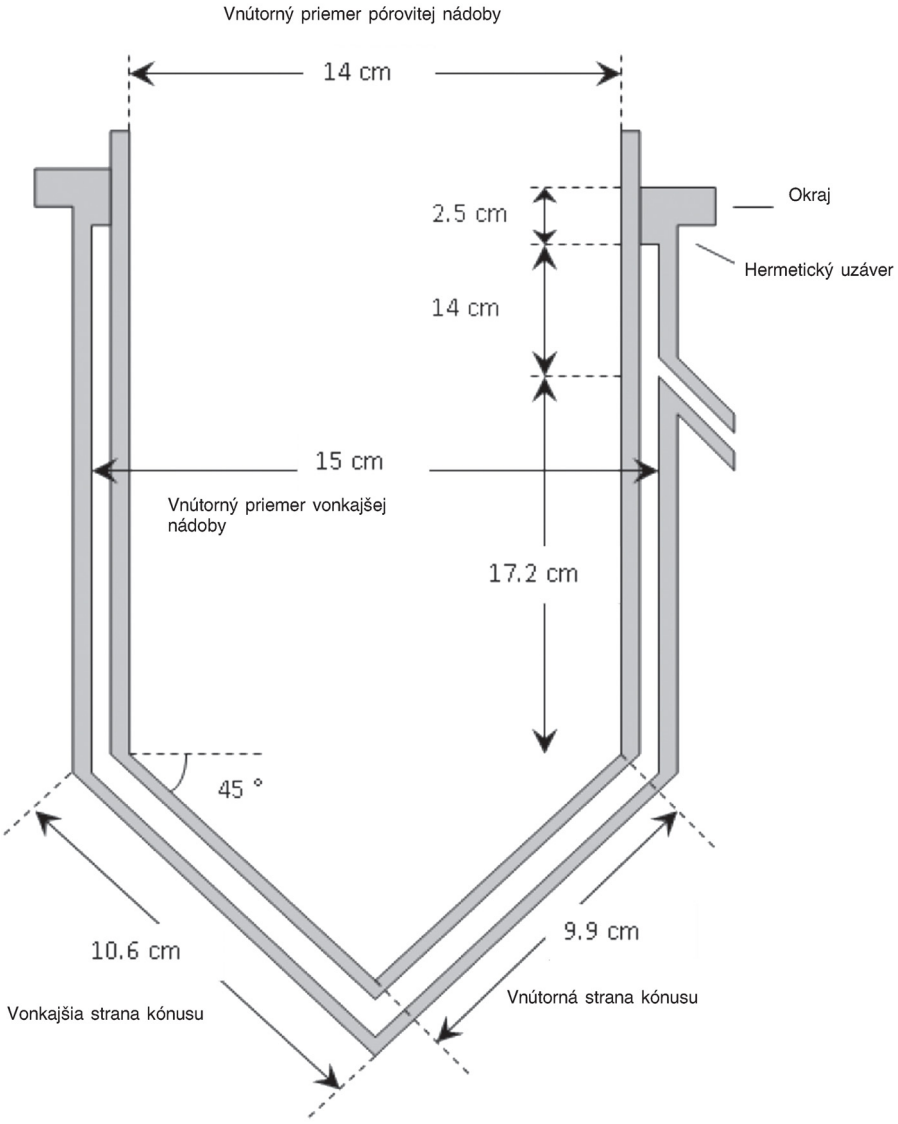
F. Difúzor

G. Vzduchový prietokomer

▼M4

Obrázok 3

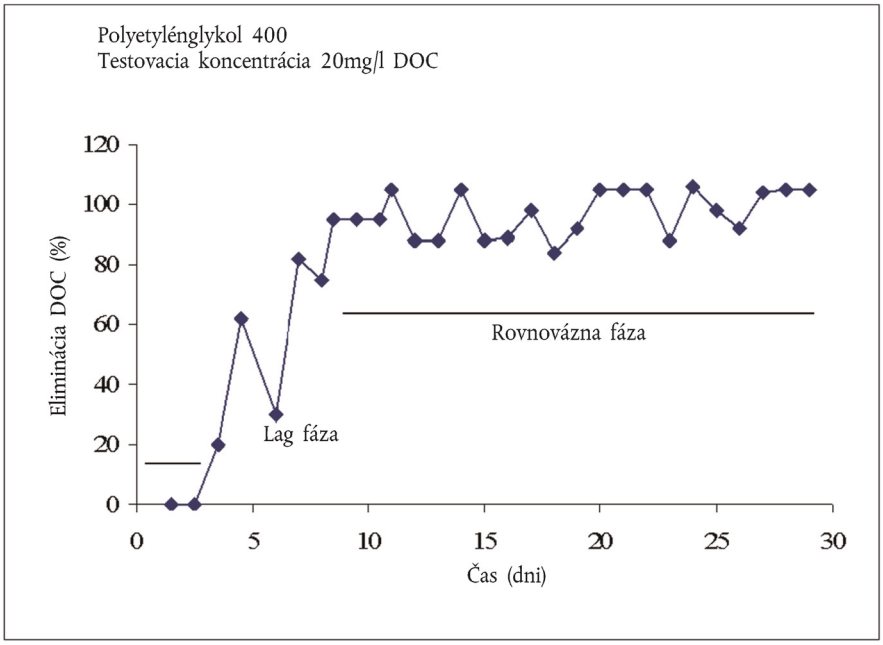
Detaily trojlitrovej pórovitej prevzdušňovacej nádoby



▼**M4**

Dodatok 2

Príklad krivky eliminácie



▼M4

Dodatok 3

[INFORMATÍVNY]

SPÁJANIE TESTOVACÍCH JEDNOTIEK

V úsilí o vyrovnanie populácie mikróbov v kaloch v testovacej jednotke, do ktorej sa pridávajú odpadové vody a testované chemikália, a v kontrolnej jednotke, do ktorej sa pridávajú iba odpadové vody, bola zavedená každodenná vzájomná výmena kalu (1). Postup sa nazýva spájanie a metóda je známa ako metóda spojených jednotiek. Spájanie sa prvýkrát vykonalo s použitím jednotiek Husmann s technológiou aktivovaného kalu, ale vykonáva sa aj s pórovitými nádobami (2) (3). Nezistili sa žiadne významné rozdiely vo výsledkoch medzi nespojenými a spojenými jednotkami, či už ide o jednotky Husmann alebo pórovité nádoby, preto z vynaloženého času a energie potrebnej na spájanie jednotiek nevyplýva žiadna výhoda.

Výmeny kalu môžu vytvárať dojem pomerne významnej eliminácie, lebo časť testovanej chemikálie sa prenesie a koncentrácie testovanej chemikálie v testovacích a kontrolných výtokoch sa do väčšej miery takmer vyrovnajú. Preto sa musia použiť faktory korekcie, ktoré závisia od vymenenej časti a stredného hydraulického retenčného času. Ďalšie informácie o výpočte boli uverejnené (1).

Vypočíta sa korigovaný stupeň eliminácie DOC alebo COD pomocou všeobecného vzorca:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\ \%$$

kde

D_{tc} = korigované % eliminácie DOC alebo COD,

D_t = stanovené % eliminácie DOC alebo COD,

a = vymenená časť objemu jednotiek s technológiou aktivovaného kalu,

r = stredný hydraulický retenčný čas (h).

Ak sa napríklad vymení polovica objemu prevzdušňovacej nádrže (a = 0,5) a stredný hydraulický retenčný čas je 6 h, korekčný vzorec je:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

LITERATÚRA

1. Fischer, W., Gerike, P., Holtmann, W. (1975). Biodegradability Determinations via Unspecific Analyses (Chemical Oxygen Demand, DOC) in Coupled Units of the OECD Confirmatory Test. I The test. Wat. Res. 9: 1131 – 1135.

2. Painter, H. A., Bealing, D. J. (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. s. 113 – 138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen, B. N., Muntau, H., Angeletti, G.

3. Painter, H. A., King, E. F. (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

▼M4

Dodatok 4

HODNOTENIE INHIBÍCIE AKTIVOVANÉHO KALU

Postup s testovanými chemikáliami

1. Chemikália (alebo odpadová voda) sa v simulačnom teste nemusí degradovať alebo odstrániť a môže mať na mikroorganizmy v kale dokonca inhibičný účinok. Iné chemikálie sa biodegradujú pri nízkych koncentráciách ale pri vyšších koncentráciách sú inhibičné (horméza). Inhibičné účinky sa môžu zistiť v skoršej fáze alebo sa môžu určiť v teste toxicity s použitím inokula podobného alebo rovnakého ako inokulum použité v simulačnom teste (1). Takýmito metódami sú inhibícia absorpcie kyslíka [kapitola C.11 tejto prílohy (2) a ISO 8192(3)] alebo inhibícia množenia organizmov v kale [ISO 15522 (4)].

2. V simulačnom teste sa inhibícia prejaví tak, že rozdiel v rozpustenom organickom uhlíku (DOC) alebo v chemickej spotrebe kyslíka (COD) medzi výtokom z testovacej nádoby a výtokom z kontrolnej nádoby bude väčší ako DOC pridaný ako testovaná chemikália. Inak povedané percentuálna eliminácia DOC (a biochemickej spotreby kyslíka BOD, chemickej spotreby kyslíka COD a/alebo NH^{+}_{4}) organického média pri čistení sa zníži prítomnosťou testovanej chemikálie. Ak taká situácia nastane, je potrebné test opakovať a znižovať koncentráciu testovanej chemikálie, až kým sa nedosiahne úroveň, pri ktorej nedochádza k inhibícii, prípadne koncentráciu ďalej znižovať, kým nedôjde k biodegradácii testovanej chemikálie. Ak má však testovaná chemikália (alebo odpadová voda) na proces nepriaznivé účinky pri všetkých koncentráciách, znamená to, že chemikáliu je možné ťažko, ak vôbec, biologicky spracovať, ale môže byť vhodné zopakovať test s aktivovaným kalom z iného zdroja a/alebo umožniť postupnejšiu aklimatizáciu kalu.

3. Naopak, ak sa testovaná chemikália v simulačnom teste bioeliminuje pri prvom pokuse, jej koncentrácia by sa mala zvýšiť, ak je nutné zistiť, či by chemikália mohla mať inhibičný účinok.

4. Pri určovaní stupňov inhibície je potrebné mať na pamäti, že populácia v aktivovanom kale sa môže meniť, takže mikroorganizmy si časom môžu vybudovať voči inhibičnej chemikálii toleranciu.

5. Výpočet stupňa inhibície:

   Celkové percentuálne eliminácie R_o pre BOD, DOC, COD atď. pre testovacie a kontrolné jednotky možno vypočítať podľa tohto vzorca:

$$R_o = 100\ (I - E)/I\ \%$$

   kde:

   I = koncentrácia BOD, DOC, COD atď. v prítoku pre testovacie alebo kontrolné nádoby (mg/l),

   E = príslušné koncentrácie vo výtoku (mg/l).

   I a E sa musia korigovať vzhľadom na DOC v dôsledku testovanej chemikálie v testovacích jednotkách, inak budú výpočty percentuálnej inhibície nesprávne.

▼**M4**

Stupeň inhibície spôsobený prítomnosťou testovanej chemikálie sa môže vypočítať podľa vzorca:

$$\%\text{inhibície} = 100\ (R_c - R_t)/R_c$$

kde:

R_c = percentuálna eliminácia v kontrolných nádobách,

R_t = percentuálna eliminácia v testovacích nádobách.

LITERATÚRA

1. Reynolds, L. a kol. (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere 16: 2 259.
2. Kapitola C.11 tejto prílohy, Biodegradácia – respiračno-inhibičný test aktivovaného kalu.
3. ISO 8192 (2007) Kvalita vody. Skúška inhibície spotreby kyslíka aktivovaným kalom na oxidáciu uhlíka a amónnych iónov.
4. ISO 15522 (1999) Water Quality – Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

▼M4

Dodatok 5

Testované chemikálie so slabou rozpustnosťou vo vode – prchavé chemikálie

Chemikálie so slabou rozpustnosťou vo vode

Podľa všetkého bolo publikovaných len málo správ o testoch chemikálií so slabou rozpustnosťou vo vode alebo nerozpustných chemikálií simulujúcich čistenie odpadových vôd (1) (2) (3).

Neexistuje ani jedna metóda disperzie testovanej chemikálie, ktorá by sa mohla aplikovať na všetky nerozpustné chemikálie. Dva zo štyroch druhov metód opísaných v norme ISO 10634 (4) sa zdajú byť vhodné na pokus o disperziu testovaných chemikálií pri simulačnom testovaní: je to použitie emulgátorov a/alebo ultrazvukovej energie. Je potrebné stanoviť stabilitu počas najmenej 24-hodinových intervalov výslednej disperzie. Vhodne stabilizované disperzie obsiahnuté v nádrži s nepretržitým miešaním (odsek 38) sa potom dávkujú do prevzdušňovacej nádrže oddelene od domácich splaškových vôd (alebo syntetických médií).

Ak sú disperzie stabilné, je potrebné preskúmať, ako možno testovanú chemikáliu určiť v disperznej forme. Je nepravdepodobné, že by bola vhodná hodnota DOC, preto je potrebné pre testovanú chemikáliu stanoviť špecifickú analytickú metódu, ktorá by sa mohla použiť na výtoky, tuhé látky vo výtokoch a aktivovaný kal. Osud testovanej chemikálie pri simulácii procesu aktivovaného kalu sa následne určí v tekutej a v tuhej fáze. Stanoví sa teda „hmotnostná bilancia“ s cieľom určiť, či sa testovaná chemikália biodegradovala. Tento postup by však indikoval iba primárnu biodegradáciu. Je potrebné pokúsiť sa o preukázanie úplnej biodegradácie prostredníctvom respirometrického testu na ľahkú biodegradovateľnosť [kapitola C.4 tejto prílohy (5) C, F alebo D] pomocou kalu exponovaného testovanej chemikálii v simulačnom teste ako inokula.

Prchavé chemikálie

Použitie simulácií čistenia odpadových vôd v prípade prchavých chemikálií je diskutabilné a problematické. Podobne ako v prípade testovaných chemikálií so slabou rozpustnosťou vo vode bolo zdá sa uverejnených len málo správ opisujúcich simulačné testy s použitím prchavých látok. Bežne používaný druh zariadenia na úplné miešanie sa upraví tak, že sa hermeticky uzavrú prevzdušňovacie a usadzovacie nádrže, pomocou prietokometrov sa meria a kontroluje prúd vzduchu a vychádzajúci plyn sa vháňa do zachytávačov s cieľom zachytiť prchavú organickú látku. V niektorých prípadoch sa používa vákuová pumpa na prečerpávanie vychádzajúceho plynu cez „studený“ zachytávač alebo čistiaci zachytávač obsahujúci Tenax a silikagél pre plynovochromatografickú analýzu. Testovaná chemikália prítomná v zachytávači sa môže určiť analyticky.

Test sa vykoná v dvoch častiach. Jednotky sa najskôr prevádzkujú bez kalu, ale so syntetickou odpadovou vodou a testovanou chemikáliou, ktorá sa prečerpáva do prevzdušňovacej nádrže. Niekoľko dní sa odoberajú vzorky prítoku, výtoku a vychádzajúceho plynu a analyzujú sa s cieľom zistiť, či neobsahujú testovanú chemikáliu. Zo zozbieraných údajov možno vypočítať percento (R_{vs}) testovanej chemikálie odobratej zo systému stripovaním.

Následne sa vykoná bežný biologický test (s kalom) za rovnakých prevádzkových podmienok ako v štúdii stripovania. Vykonajú sa aj merania DOC alebo COD s cieľom preveriť, či jednotky fungujú účinne. V prvej časti testu sa vykonajú príležitostné analýzy na stanovenie testovanej chemikálie v prítoku, výtoku a vychádzajúcom plyne. Po aklimatizácii sa analýzy robia častejšie. Z údajov v stabilnom stave možno opäť vypočítať percentuálnu elimináciu testovanej chemikálie z tekutej fázy všetkými postupmi (R_T) (fyzické a biologické), ako aj podiel (R_V), ktorý bol zo systému odobratý stripovaním.

▼**M4**

Výpočet:

a) V nebiologickom teste možno percento (R_{VP}) testovaného materiálu odobratého zo systému stripovaním vypočítať podľa tohto vzorca:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

kde

R_{VP} = eliminácia testovanej chemikálie vyprchaním (%),

S_{VP} = testovaná chemikália zachytená v zachytávači vyjadrená ako ekvivalentná koncentrácia v tekutej fáze (mg/l),

S_{IP} = koncentrácia testovanej chemikálie v prítoku (mg/l).

b) V biologickom teste možno percento (R_V) testovaného materiálu odobratého zo systému stripovaním vypočítať podľa tohto vzorca:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

kde

R_V = eliminácia testovanej chemikálie vyprchaním v biologickom teste (%),

S_V = testovaná chemikália zachytená v zachytávači v biologickom teste vyjadrená ako ekvivalentná koncentrácia v tekutom prítoku (mg/l),

S_I = koncentrácia testovanej chemikálie v prítoku (mg/l).

c) V biologickom teste sa percento (R_V) testovanej chemikálie odstránenej všetkými postupmi vypočíta takto:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

kde

S_E = koncentrácia testovanej chemikálie v (tekutom) výtoku (mg/l).

d) Percento (R_{BA}) odstránené biodegradáciou a adsorpciou teda možno vypočítať podľa tohto vzorca:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Je potrebné vykonať samostatné testy s cieľom určiť, či testovaná chemikália adsorbuje, a ak áno, možno urobiť ďalšiu korekciu.

e) Porovnanie podielu testovanej chemikálie odobratej stripovaním z biologického (R_v) a nebiologického testovacieho (R_{vp}) systému indikuje celkový účinok, ktorý má biologické spracovanie na emisiu testovanej chemikálie do ovzdušia.

Príklad: Benzén

Retenčný čas kalu = 4 dni

Syntetické médiá, retenčný čas = 8 h

S_{IP} = S_I = 150 mg/l

S_{VP} = 150 mg/l (S_{EP} = 0)

S_V = 22,5 mg/l

S_E = 50 µg/l

▼**M4**

Teda

R_{VP} = 100 %, R_V = 15 %

R_T = 100 % a R_{BA} = 85 %.

Usúdilo sa, že benzén neadsorboval na kale.

LITERATÚRA

1. Horn, J. A., Moyer, J. E., Hale, J. H. (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939 – 854.

2. Pitter, P., Chudoba, J. (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.

3. Stover, E. L., Kincannon, D. F. (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.

4. ISO 10634 (1995) Kvalita vody. Pokyny na prípravu a spracovanie organických látok málo rozpustných vo vode na následné hodnotenie ich biodegradability vo vodnom prostredí.

5. Kapitola C.4 tejto prílohy, Stanovenie „ľahkej“ biodegradovateľnosti.

▼M4

Dodatok 6

Účinky retenčného času kalu (SRT) na odbúrateľnosť chemikálií

ÚVOD

1. Metóda opísaná v základnom texte bola vypracovaná s cieľom uistiť sa, či sa testované chemikálie (zvyčajne tie, ktoré sú známe ako inherentné, nie však ľahko biodegradovateľné) môžu biodegradovať v rámci limitov súvisiacich s čistiarňami odpadových vôd. Výsledky sú vyjadrené ako percento eliminácie a percento biodegradácie. Prevádzkové podmienky jednotiek s technológiou aktivovaného kalu a výber prítoku umožňujú pomerne rozsiahle variácie koncentrácií testovanej chemikálie vo výtoku. Testy sa vykonávajú iba pri jednej nominálnej koncentrácii tuhých látok v kale alebo pri jednom nominálnom retenčnom čase kalu (SRT), pričom opísané režimy odstraňovania kalu môžu spôsobiť, že sa hodnota SRT počas testu bude výrazne meniť, a to zo dňa na deň, ako aj počas dňa.

2. V tomto variante (1) (2) sa SRT kontroluje v rámci oveľa užších limitov počas každého 24-hodinového intervalu (ako v prípade veľkých čistiarní), čo má za následok stálejšiu koncentráciu vo výtokoch. Odporúča sa použiť domáce splaškové vody, lebo umožňujú dôslednejšiu a vyššiu percentuálnu elimináciu. Skúmajú sa aj účinky viacerých hodnôt SRT a v podrobnejšej štúdii možno určiť účinky škály teplôt na koncentráciu vo výtoku.

3. Zatiaľ neexistuje všeobecná zhoda o tom, ktoré kinetické modely prebiehajú, keď sa chemikálie biodegradujú v podmienkach čistenia odpadových vôd. Pre zozbierané údaje bol vybratý Monodov model bakteriálneho rastu a využitia substrátu (1) (2), lebo táto metóda je určená iba pre chemikálie produkované vo veľkých hmotnostiach, ktorých koncentrácia v splaškových vodách je vyššia ako 1 mg/l. Platnosť zjednodušeného modelu a vyvodených predpokladov sa stanovila pomocou súboru etoxylátov alkoholov s rôznymi stupňami primárnej biodegradovateľnosti (2) (3).

Poznámka: Tento variant metódy sa úzko pridŕža väčšiny znenia tejto testovacej metódy C.10-A a ďalej sú uvedené iba tie údaje, ktoré sa líšia.

PRINCÍP TESTU

4. Jednotky pórovitých nádob s aktivovaným kalom navrhnuté s cieľom zabezpečiť (takmer) nepretržité odstraňovanie miešanej tekutiny umožňujúce veľmi presnú kontrolu retenčného času kalu (SRT alebo θ_s) sú prevádzkované bez spojenia pri niekoľkých retenčných časoch kalu (SRT) a nepovinne pri niekoľkých teplotách. Retenčný čas je zvyčajne dva až desať dní a teplota je v rozmedzí 5 a 20 °C. Splaškové vody, najlepšie domáce, a roztok testovanej chemikálie sa do jednotiek dávkujú zvlášť rýchlosťou, ktorou sa zabezpečí požadovaný retenčný čas splaškových vôd (tri až šesť hodín) a požadovaná koncentrácia testovanej chemikálie v prítoku. Na účely porovnávania súbežne fungujú kontrolné jednotky, do ktorých sa nepridáva testovaná chemikália.

5. Možno použiť aj iný druh zariadenia, ale je potrebné venovať pozornosť tomu, aby sa zabezpečila dobrá kontrola SRT. Napríklad pri použití čistiarní, ktoré zahŕňajú sedimentačnú nádrž, môže byť nevyhnutné stanoviť toleranciu straty tuhých látok cez výtok čistiarne. Takisto je potrebné prijať opatrenia, aby sa predišlo chybám v dôsledku kolísania množstva kalu v sedimentačnej nádrži.

▼M4

6. Jednotky sú prevádzkované v každom zvolenom súbore podmienok a po dosiahnutí rovnováhy sa získajú priemerné stabilné koncentrácie testovanej chemikálie vo výtokoch, prípadne aj DOC za obdobie približne troch týždňov. Okrem hodnotenia percentuálnej eliminácie testovanej chemikálie, prípadne DOC, sa v grafickej podobe vyjadrí aj vzťah medzi prevádzkovými podmienkami čistiarne a koncentráciou vo výtoku. Z tohto vyjadrenia možno vypočítať predbežné kinetické konštanty a predpovedať podmienky, za ktorých sa testovaná chemikália môže odbúrať.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

7. Kapitola C.10 A, uplatňujú sa odseky 12 a 13.

ÚROVNE ÚSPEŠNOSTI

8. Kapitola C.10 A, uplatňujú sa odseky 14 a 15.

REFERENČNÁ TESTOVANÁ CHEMIKÁLIA

9. Kapitola C.10 A, uplatňuje sa odsek 16

REPRODUKOVATEĽNOSŤ VÝSLEDKOV TESTU

10. Kapitola C.10 A, uplatňujú sa odseky 17 a 18.

OPIS METÓDY

Zariadenie

11. Vhodnou jednotkou je modifikovaný systém pórovitej nádoby (dodatok 6.1). Pozostáva z vnútornej nádoby (alebo vložky) vyrobenej z pórovitého polypropylénu s hrúbkou 3,2 mm a s veľkosťou pórov približne 90 μm, pričom spoj je bezšvový. (Ide o mohutnejšiu jednotku v porovnaní s jednotkou, ktorá je opísaná v odseku 21 tejto kapitoly C.10 A). Vložka je osadená do nepriepustnej polyetylénovej vonkajšej nádoby, ktorá sa skladá z dvoch častí: kruhová základňa s prevŕtanými dierami na umiestnenie dvoch vzduchovodov a trubice na odstránenie kalu, a vrchný valec, ktorý sa závitom pripevní na základňu a ktorý má vývod umiestnený tak, aby do pórovitej nádoby privádzal známy objem (3 l). Jeden zo vzduchovodov je osadený difúznym kameňom, druhý má otvorený koniec a je umiestnený v pravom uhle ku kameňu v nádobe. Tento systém vytvára potrebné vírenie zabezpečujúce, že obsah v nádobe sa dôkladne premiešava, a takisto zabezpečuje koncentrácie rozpusteného kyslíka vyššie ako 2 mg/l.

12. Zachováva sa primeraný počet jednotiek pri kontrolovaných teplotách v rozsahu od 5 do 20 °C (± 1 °C) buď vo vodných kúpeľoch, alebo v miestnostiach s konštantnou teplotou. Čerpadlá musia do prevzdušňovacích nádob dávkovať roztok testovanej chemikálie a usadené splaškové vody požadovanými rýchlosťami (0 – 1,0 ml/min a 0 – 25 ml/min) a tretie čerpadlo odstraňuje odpadový kal z prevzdušňovacích nádob. Potrebná veľmi nízka prietoková rýchlosť odpadového kalu sa dosiahne nastavením čerpadla na vyššiu rýchlosť, pričom jeho činnosť sa preruší pomocou časového spínača, napr. je činný desať sekúnd každú minútu pri rýchlosti prečerpávania 3 ml/min, čím sa dosiahne rýchlosť odstraňovania 0,5 ml/min.

Filtračné zariadenie alebo odstredivka

13. Kapitola C10 A, uplatňuje sa odsek 23.

Analytické zariadenie

14. Kapitola C.10 A, uplatňuje sa odsek 24.

Voda

▼M4

15. Kapitola C.10 A, uplatňujú sa odseky 25 a 26.

Organické médium

16. Kapitola C.10 A, uplatňuje sa odsek 27.

Syntetické médiá

17. Kapitola C.10 A, uplatňuje sa odsek 28.

Domáce splaškové vody

18. Kapitola C.10 A, uplatňuje sa odsek 29.

Aktivovaný kal

19. Kapitola C10 A, uplatňuje sa odsek 30.

Zásobné roztoky testovanej chemikálie

20. Kapitola C.10 A, uplatňujú sa odseky 31 a 32.

POSTUP

Príprava inokula

21. Kapitola C.10 A, uplatňuje sa iba odsek 34 – použije sa aktivovaný kal (približne 2,5 g/l).

Počet testovacích jednotiek

22. Pri jednoduchom teste, t. j. na meranie percentuálnej eliminácie, sa vyžaduje iba jeden SRT, ale na získanie údajov potrebných na výpočet predbežných kinetických konštánt je potrebných štyri alebo päť hodnôt SRT. Zvyčajne sa vyberú hodnoty medzi dvoma a desiatimi dňami. Z praktického hľadiska je vhodné vykonať test pri štyroch alebo piatich retenčných časoch kalu (SRT) súčasne pri jednej teplote. V rozšírených štúdiách sa použijú rovnaké hodnoty SRT alebo prípadne iný rozsah hodnôt pri iných teplotách v rozsahu 5 – 20 °C. Na primárnu biodegradáciu (základné použitie) je zvyčajne potrebná iba jedna jednotka pre daný súbor podmienok. Na úplnú biodegradáciu je však potrebná kontrolná jednotka pre každý súbor podmienok, do ktorej sa pridávajú splaškové vody, ale nie testovaná chemikália. Ak sa predpokladá prítomnosť testovanej chemikálie v použitých splaškových vodách, je potrebné pri hodnotení primárnej biodegradácie a aplikovaní potrebných korekcií vo výpočtoch použiť kontrolné jednotky.

Dávkovanie organického média a testovanej chemikálie

23. Kapitola C.10 A, platia odseky 36 – 39, ale treba zohľadniť skutočnosť, že roztok testovanej chemikálie sa dávkuje zvlášť a že sa použijú rôzne rýchlosti odstraňovania kalu. Takisto treba monitorovať a v prípade potreby upraviť, v rozsahu ± 10 %, prietokové rýchlosti prítokov, výtokov a odstraňovania kalu, napr. dvakrát denne. Ak sa v analytických metódach objavia problémy pri používaní domácich splaškových vôd, test je potrebné vykonať s použitím syntetických médií, treba sa však uistiť, že iné médiá prinesú porovnateľné kinetické údaje.

Manipulácia s jednotkami s technológiou aktivovaného kalu

24. Kapitola C.10 A, uplatňujú sa odseky 40 – 43, SRT však treba iba „konštantným“ odstraňovaním kalu.

Odber vzoriek a analýza

25. Kapitola C.10 A, platia odseky 44 – 50, s výnimkou, že je potrebné určiť koncentráciu testovanej chemikálie a nepovinne DOC, COD by sa nemala použiť.

▼M4

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

26. Kapitola C.10 A, uplatňujú sa odseky 52 – 54.

Vyjadrenie výsledkov testu

27. Kapitola C.10 A, uplatňujú sa odseky 56 – 62.

Výpočet kinetických konštánt

28. Je reálnejšie uviesť strednú stabilnú koncentráciu testovanej chemikálie vo výtoku a opísať, ako sa mení s prevádzkovými podmienkami čistiarne, ako uviesť percentuálnu primárnu biodegradáciu. To je možné zvážením rovnice (6) v dodatku 6.2, ktorá môže priniesť hodnoty pre K_S, μ_m a θ_{SC}, kritický retenčný čas kalu.

[Približné hodnoty K_S a μm možno prípadne získať pomocou jednoduchého počítačového programu s cieľom prispôsobiť teoretickú krivku vypočítanú z rovnice 2 (dodatok 6.2) získaným experimentálnym hodnotám. Hoci žiadny konkrétny roztok nebude jedinečný, možno získať primeranú približnú hodnotu K_S a μ_m.]

Variabilita výsledkov

29. Je bežnou praxou, že pre jednotlivé chemikálie sa získavajú premenlivé hodnoty kinetických parametrov. Predpokladá sa, že podmienky, v ktorých kal rástol, ako aj podmienky, ktoré prevažujú v použitom teste (podobne ako v odseku 5 a v iných testoch), majú veľký vplyv na výsledné hodnoty. Jednému aspektu tejto variability sa venoval Grady a kol. (4), ktorý navrhol používanie výrazov „existujúci“ a „vnútorný“ pre dve extrémne podmienky predstavujúce ohraničenie fyziologického stavu, ktorý môže kultúra dosiahnuť počas kinetického pokusu. Ak sa stav nesmie počas testu zmeniť, hodnoty kinetických parametrov odrážajú podmienky v prostredí, z ktorého boli mikroorganizmy odobraté. Tieto hodnoty sa nazývajú „existujúce“ alebo momentálne existujúce. Pri opačnom extréme, ak podmienky v teste dovoľujú úplné vytvorenie systému syntetizujúceho proteíny, ktorý umožňuje maximálnu možnú rýchlosť rastu, sa získané kinetické parametre nazývajú „vnútorné“ a závisia iba od charakteru substrátu a od druhov baktérií v kultúre. Pomôckou je, že existujúce hodnoty sa získajú udržiavaním nízkeho pomeru koncentrácie substrátu k príslušným mikroorganizmom (S_o/X_o), napr. 0,025, a vnútorné hodnoty sa získajú, keď je pomer vysoký, napr. najmenej 20. V obidvoch prípadoch by hodnota S_o mala byť rovná alebo vyššia ako príslušná hodnota Ks, konštanta polovičného nasýtenia.

30. Variabilita a iné aspekty biodegradačnej kinetiky sa preberali na nedávnom seminári SETAC (5). Takéto štúdie, o ktorých sa podali správy a ktoré sú plánované, by mali poskytnúť jasnejší pohľad na kinetiku prebiehajúcu v čistiarňach odpadových vôd, aby sa umožnila lepšia interpretácia existujúcich údajov a takisto aby sa v budúcnosti navrhovali vhodnejšie testovacie metódy.

LITERATÚRA:

1. Birch, R. R. (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33 – 48.

2. Birch, R. R. (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340 – 343.

3. Birch, R. R. (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Technická Biotechnol., 50: 411 – 422.

▼**M4**

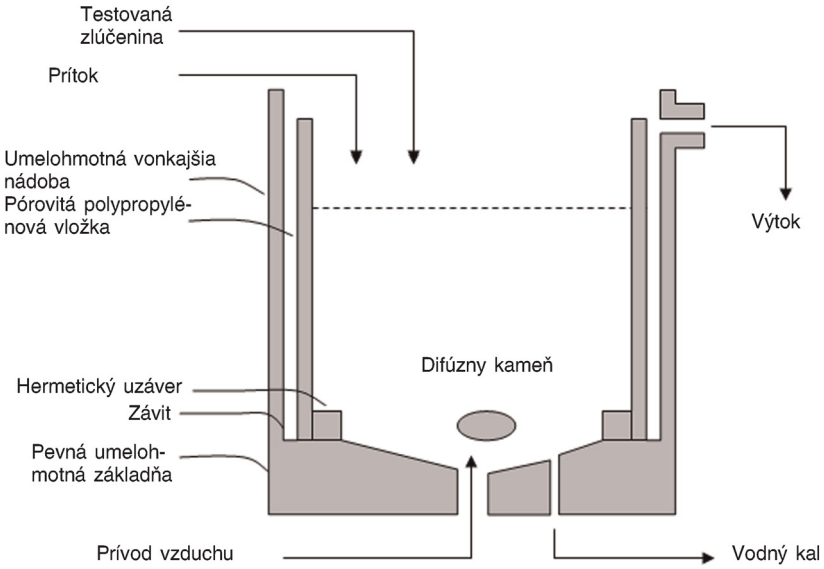
4. Grady, C. P. L., Smets, B. F., a Barbeau, D. S. (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. Wat. Res., 30 (3): 742 – 748.

5. Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales S. G., Feitjel T., King H., Fox K., Verstraete W. 4. – 6. sept. 1996. SETAC- Európa, Brusel.

▼**M4**

Dodatok 6.1

Pórovitá nádoba s kontrolou SRT



▼M4

Dodatok 6.2

Výpočet kinetických konštánt

1. Za predpokladu, že sa použije Monodova kinetika, a s prihliadnutím na hmotnostnú rovnováhu aktívnych tuhých látok a substrátu v celom systéme aktivovaného kalu (1), možno získať tieto vyjadrenia stabilného stavu:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \qquad [1]$$

alebo

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \qquad [2]$$

kde

S_1 = koncentrácia substrátu vo výtoku, (mg/l),

K_S = konštanta polovičného nasýtenia, koncentrácia, pri ktorej $\mu = \mu_m/2$ (mg/l),

μ = špecifická miera rastu (d^{-1}),

μ_m = maximálna hodnota μ_m (d^{-1}),

K_d = špecifická rýchlosť rozpadu aktívnych tuhých látok (d^{-1}),

θ_S = stredný retenčný čas kalu, SRT d).

Preskúmanie tejto rovnice vedie k týmto záverom:

i) Koncentrácia vo výtoku je nezávislá od koncentrácie v prítoku (S_0), a preto sa percentuálna biodegradácia mení spolu s koncentráciou v prítoku, S_0.

ii) Jediný parameter kontrolovaný v čistiarni, ktorý má vplyv na S_1, je retenčný čas kalu, θ_S.

iii) Pre danú koncentráciu v prítoku, S_0, bude kritický retenčný čas kalu, takže:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \qquad [3]$$

kde

θ_{SC} = kritický retenčný čas kalu, pod hranicou ktorého budú príslušné mikroorganizmy vymyté z čistiarne.

iv) Keďže ostatné parametre v rovnici (2) sú spojené s kinetikou rastu, teplota pravdepodobne ovplyvní úroveň substrátu vo výtoku a kritický vek kalu, t. j. retenčný čas kalu potrebný na dosiahnutie určitého stupňa čistenia sa s klesajúcou teplotou zvýši.

2. Podľa hmotnostnej bilancie tuhých látok v systéme pórovitej nádoby a za predpokladu, že koncentrácia tuhých látok vo výtoku čistiarne X_2 je v porovnaní s koncentráciou v prevzdušňovacej nádobe X_1 nízka, retenčný čas kalu

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \qquad [4]$$

▼**M4**

a

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

kde

V = objem prevzdušňovacej nádoby (l),

X_1 = koncentrácia tuhých látok v prevzdušňovacej nádobe (mg/l),

X_2 = koncentrácia tuhých látok vo výtoku (mg/l),

Q_0 = prietoková rýchlosť prítoku (l/d),

Q_1 = prietoková rýchlosť odpadového kalu (l/d).

Retenčný čas kalu teda možno kontrolovať pri akejkoľvek vopred zvolenej hodnote prostredníctvom kontroly prietokovej rýchlosti odpadového kalu, Q_1.

Závery

3. Hlavným účelom testu je teda umožniť predvídanie koncentrácie vo výtoku, a teda aj úrovne testovanej chemikálie vo vode, do ktorej sa chemikália pridáva.

4. Zakreslením S_1 oproti θ_S možno niekedy okamžite vyhodnotiť kritický retenčný čas kalu, θ_{SC}, napr. krivka 3 na obrázku 1. Ak to nie je možné, θ_{SC} spolu s približnými hodnotami μ_m a K_S možno vypočítať zakreslením S_1 oproti $S_1 \bullet \theta_S$.

Podľa úpravy rovnice (1):

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [5]$$

Ak je K_d nízke, potom $1 + \theta_s \bullet K_d \sim 1$ a z rovnice [5] dostaneme:

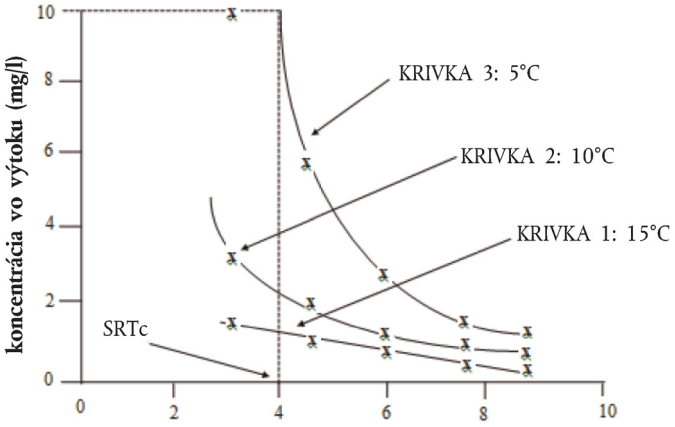
$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \qquad [6]$$

Nákres by teda mala byť rovná priamka (pozri obrázok 2) so sklonom $1/\mu_m$ a priesečníkom K_S/μ_m; takisto $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

▼M4

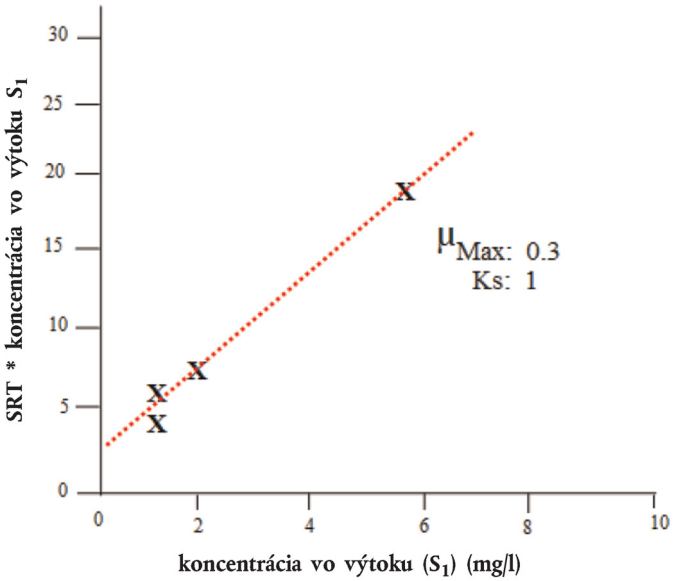
Obrázok 1

Tri teploty, päť retenčných časov kalu SRT



Obrázok 2

Regresná krivka SRT · S_1 oproti S_1, keď T = 5 °C



Glosár:

Koncentrácia vo výtoku:

Krivka:

▼M4

Dodatok 7

TEST PRI NÍZKOM (μg/l) ROZSAHU KONCENTRÁCIE

1. Mnohé chemikálie sú vo vodnom prostredí, dokonca v odpadových vodách, bežne prítomné pri veľmi nízkych koncentráciách (μg/l). Pri takýchto koncentráciách pravdepodobne neslúžia ako primárny substrát pre rast, ale oveľa pravdepodobnejšie degradujú ako nerastové, sekundárne substráty prítomné súčasne s množstvom prirodzene sa vyskytujúcich uhlíkových chemikálií. Degradácie týchto chemikálií preto nezodpovedajú modelu opísanému v dodatku 6. Existuje veľa modelov, ktoré by sa mohli použiť, a v podmienkach prevažujúcich v čistiarňach odpadových vôd by mohli prebiehať viaceré súčasne. Na objasnenie tohto problému bude potrebný ďalší rozsiahlejší výskum.

2. Dovtedy sa možno riadiť postupom uvedeným v základnom texte (kapitola C.10 A), ale len pre primárnu biodegradovateľnosť s použitím primerane nízkych koncentrácií (< 100 μg/l) a validovaného analytického postupu. Percentuálnu biodegradáciu možno vypočítať (pozri odsek 54 testovacej metódy), ak sa zohľadnia abiotické procesy (adsorpcia, prchavosť atď.). Príkladom je štúdia, ktorú vypracoval Nyholm a jeho spolupracovníci (1) (2), využívajúca štvorhodinový cyklus v systéme plnenia a odčerpávania. Do správy uviedli pseudokonštanty prvého rádu pre päť chemikálií pridaných do syntetických médií v koncentrácii 5 – 100 μg/l. (Pre úplnú biodegradovateľnosť sa môžu použiť testované chemikálie označené ^{14}C. Tento opis presahuje rámec tejto testovacej metódy, lebo zatiaľ neexistuje zhoda o postupoch, hoci navrhovaná metóda pre ISO 14592 (3) obsahuje usmernenie k použitiu chemikálií označených ^{14}C.).

SCAS test

3. Neskôr bol navrhnutý jednoduchší dvojfázový test (4) (5) (6), po metóde polosúvislého aktivovaného kalu (SCAS) nasledujú krátkodobé kinetické testy na vzorkách odobratých z jednotiek SCAS. SCAS systém funguje so známymi rýchlosťami odstraňovania kalu (na rozdiel od pôvodnej testovacej metódy C.12) a napúšťa sa modifikovanými syntetickými médiami OECD alebo domácimi splaškovými vodami. Syntetické médiá boli modifikované (z dôvodu meniacej sa hodnoty pH a slabej usadzovacej schopnosti kalu) pridaním fosfátu ako tlmivého roztoku, kvasnicového extraktu, chloridu železitého a stopových prvkov solí a ich COD sa zvýšila približne na 750 mg/l zvýšením koncentrácie peptónu a mäsového extraktu. Jednotky boli prevádzkované v 24-hodinovom cykle: prevzdušňovanie počas 23 h, odstraňovanie kalu, usadzovanie, odoberanie supernatantu (výtok), po ktorom nasledovalo pridanie syntetických médií a testovanej chemikálie až na úroveň 100 μg/l, (t. j. pri približne rovnakej koncentrácii ako v krátkodobom teste). Raz týždenne sa vymenilo 10 % celkového kalu za čerstvý kal, aby sa zachovala vyvážená populácia mikróbov.

4. Koncentrácie testovanej chemikálie sa merajú na začiatku a na konci prevdzušňovania a test pokračuje, až kým sa nedosiahne konštantná eliminácia testovanej chemikálie, čo trvá od jedného týždňa až niekoľko mesiacov.

Krátkodobý test

5. Krátkodobý test (napr. osem hodín) sa používa na určenie (pseudo)konštanty kinetickej rýchlosti prvého rádu pre rozklad testovanej chemikálie v aktivovanom kale známeho ale rozdielneho pôvodu a histórie. Konkrétne, vzorky kalu sa odoberajú zo SCAS reaktorov – na konci prevzdušňovacieho obdobia, keď je koncentrácia organického substrátu nízka – v priebehu testu aklimatizácie (odseky 3, 4). Kal sa môže na porovnanie odobrať aj zo súbežnej SCAS jednotky, ktorá nebola exponovaná testovanej chemikálii. Zmesi kalu a testovanej chemikálie pridané v dvoch alebo viacerých

▼M4

koncentráciách v rozsahu 1 – 50 µg/l sa prevzdušňujú bez pridávania syntetických médií alebo iného organického substrátu. Testovaná chemikália, ktorá ostala v roztoku, sa určuje v pravidelných intervaloch, napr. každú hodinu, v závislosti od degradovateľnosti chemikálie v období nepresahujúcom 24 h Vzorky sa pred príslušnou analýzou odstredia.

Výpočty

6. Údaje zo SCAS jednotiek sa použijú na výpočet percentuálnej eliminácie testovanej chemikálie (odsek 54). Takisto konštantu priemernej rýchlosti K_1, (štandardizovanú pre koncentráciu suspendovaných tuhých látok) možno vypočítať podľa vzorca:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g\ h)$$

kde

t = čas prevzdušňovania (23 h),

C_e = koncentrácia na konci prevzdušňovacieho obdobia (µg/l),

C_i = koncentrácia na začiatku prevzdušňovania (µg/l),

SS = koncentrácia tuhých látok v aktivovanom kale (g/l).

7. V krátkodobom teste sa zakreslí log % zostávajúcej koncentrácie v závislosti od času, pričom sklon počiatočnej časti (10 – 50 % degradácia) grafu je ekvivalentný s K_1, (pseudo)konštantou prvého rádu. Konštanta sa štandardizuje vzhľadom na koncentráciu tuhých látok v kale prostredníctvom rozdelenia sklonu koncentráciou tuhých látok v kale. Výsledok uvedený v správe musí zahŕňať aj údaje o počiatočných koncentráciách testovanej chemikálie a suspendovaných tuhých látok, retenčnom čase kalu, aplikácii a zdroji kalu, ako aj údaje o predchádzajúcej expozícii (ak k nej došlo) testovanej chemikálii.

Variabilita výsledkov

8. Variabilita a iné aspekty biodegradačnej kinetiky sa preberali na nedávnom seminári SETAC (7). Takéto štúdie, o ktorých sa podali správy a ktoré sú plánované, by mali poskytnúť jasnejší pohľad na kinetiku prebiehajúcu v čistiarňach odpadových vôd, aby sa umožnila lepšia interpretácia existujúcich údajov a takisto aby sa v budúcnosti navrhovali vhodnejšie testovacie metódy.

LITERATÚRA

1. Nyholm, N., Jacobsen, B. N., Pedersen, B. M., Poulsen, O., Dambourg, A., a Schultz, B. (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability. Wat. Res. 26: 339 – 353.

2. Jacobsen, B. N., Nyholm, N., Pedersen, B. M., Poulsen, O., a Ostfeldt, P. (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. Wat. Res. 27: 1505 – 1510.

3. ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Kvalita vody – hodnotenie aeróbnej biodegradovateľnosti organických zlúčenín pri nízkych koncentráciách vo vode.

▼**M4**

4. Nyholm, N., Ingerslev, F., Berg, U. T., Pedersen, J. P., a Frimer-Larsen, H. (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and µg/l range spiked concentrations Chemosphere 33 (5): 851 – 864.

5. Berg, U. T., a Nyholm, N. (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations. Chemosphere 33 (4): 711 – 735.

6. Danish Environmental Protection Agency. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Ministerstvo životného prostredia a energetiky, Kodaň.

7. Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, S. G. Feitjel, T. King, H. Fox, K. a Verstraete, W. 4. – 6. sept. 1996. SETAC- Európa, Brusel.

▼M4

C.10-B: Biofilmy

ÚVOD

1. Simulačné testy sa zvyčajne používajú pri chemikáliách, ktoré nevyhoveli skríningovému testu ľahkej biodegradovateľnosti [kapitola C.5 A – F tejto prílohy (9)], ale úspešne prešli testom inherentnej biodegradovateľnosti. Výnimočne sa simulačné testy používajú aj v prípade akejkoľvek chemikálie, o ktorej je potrebné získať viac informácií, najmä v prípade veľkotonážnych chemikálií, pričom zvyčajne sa použije test s aktivovaným kalom (C.10 A). Za určitých okolností sú však potrebné špecifické informácie, ktoré vypovedajú o vzťahu medzí správaním chemikálie a metódami čistenia odpadových vôd zahŕňajúcimi biofilmy, konkrétne perkolačné alebo prekvapkávajúce filtre, rotačné biologické reaktory, fluidné lôžka. S cieľom vyhovieť tejto potrebe boli vytvorené rôzne zariadenia.

2. Gerike a kolektív (1) použili veľké pilotné prekvapkávajúce filtre, ktoré použili v spojení. Tieto filtre zaberali veľa priestoru a vyžadovali si pomerne veľké množstvá splaškových vôd alebo syntetických médií. Truesdale a kolektív (2) opísali menšie filtre (priemer 183 cm × 152 mm), do ktorých sa napúšťali prírodné splaškové vody bez povrchovo aktívnych činidiel, ale stále boli potrebné pomerne veľké množstvá. Na vytvorenie „zrelého“ biofilmu bolo potrebných až 14 týždňov, a kým došlo k aklimatizácii po prvom zavedení testovaného povrchovo aktívneho činidla, bolo potrebných ďalších štyri až osem týždňov.

3. Baumann a kolektív (3) vytvorili oveľa menší filter, ktorý ako inertné médium na podporu biofilmu využíval polyesterovú „vlnu“, ktorá sa predtým namočila do aktivovaného kalu. Testovaná chemikália sa použila ako jediný zdroj uhlíka a biodegradovateľnosť sa hodnotila z meraní rozpusteného organického uhlíka (DOC) v prítoku a výtoku a z množstva CO_2 vo vychádzajúcom plyne.

4. Celkom odlišný prístup zaujali Gloyna a kolektív (4), ktorí vynašli rotačný tubulárny reaktor. Na vnútornom povrchu rotačnej trubice sa na známej povrchovej ploche vytvoril biofilm privádzaním prítoku na horný koniec trubice naklonenej k horizontálnej úrovni pod malým uhlom. Reaktor sa použil na pozorovanie biodegradovateľnosti povrchovo aktívnych činidiel (5), ako aj na skúmanie optimálnej hrúbky biofilmu a difúzie cez film (6). Títo autori reaktor ďalej vyvíjali a upravovali, aby bol schopný určiť CO_2 vo vychádzajúcom plyne.

5. Rotačný tubulárny reaktor prijal Stály výbor analytikov (Spojené kráľovstvo) ako štandardnú metódu na hodnotenie biodegradovateľnosti chemikálií (7) a odbúrateľnosti a toxicity odpadových vôd (8). Výhodami opísanej metódy sú jednoduchosť, kompaktnosť, reprodukovateľnosť a potreba pomerne malých množstiev organického média.

PRINCÍP TESTU

6. Na vnútorný povrch pomaly rotujúcej naklonenej trubice sa aplikujú syntetické médiá alebo domáce splaškové vody a testovaná chemikália v prímesi alebo samostatne. Na vnútornom povrchu sa vytvorí vrstva mikroorganizmov podobných tým, ktoré sú prítomné na médiách s biofiltrami. Podmienky činnosti reaktora sa zvolia tak, aby sa zabezpečila primeraná eliminácia organickej hmoty a, ak sa to požaduje, oxidácia amónia.

▼M4

7. Výtok z trubice sa odoberie a pred analýzou na zistenie rozpusteného organického uhlíka (DOC) a/alebo testovanej chemikálie pomocou špecifickej metódy sa buď usadí a/alebo prefiltruje. Na účely porovnávania súbežne a za tých istých podmienok fungujú kontrolné jednotky, do ktorých sa nepridáva testovaná chemikália. Predpokladá sa, že rozdiel medzi koncentráciami DOC vo výtoku z testovacích a kontrolných jednotiek vzniká v dôsledku testovanej chemikálie a jej organických metabolitov. Tento rozdiel sa porovná s koncentráciou pridanej testovanej chemikálie (ako DOC) s cieľom vypočítať elimináciu testovanej chemikálie.

8. Biodegradáciu možno od bioadsorpcie bežne odlíšiť na základe dôkladného preskúmania krivky eliminácie v závislosti od času. Potvrdiť ju zvyčajne možno pomocou testu ľahkej biodegradovateľnosti (absorpcia kyslíka alebo tvorba oxidu uhličitého) s použitím aklimatizovaného inokula odobratého na konci testu z reaktorov, do ktorých sa pridáva testovaná chemikália.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

9. Je potrebné poznať čistotu, rozpustnosť vo vode, prchavosť a adsorpčné vlastnosti testovanej chemikálie, aby bolo možné správne interpretovať výsledky.

10. Prchavé a slabo rozpustné chemikálie sa zvyčajne nemôžu testovať, pokiaľ sa neprijmú zvláštne opatrenia (pozri dodatok 5 ku kapitole C.10 A). Je nutné poznať aj chemickú štruktúru alebo aspoň empirický vzorec, aby bolo možné vypočítať teoretické hodnoty a/alebo skontrolovať namerané hodnoty parametrov, napr. teoretickú spotrebu kyslíka (ThOD).

11. Informácie týkajúce sa toxicity testovanej chemikálie pre mikroorganizmy (pozri dodatok 4 ku kapitole C.10 A) môžu byť užitočné pri výbere vhodných testovaných koncentrácií a môžu byť nevyhnutné na správnu interpretáciu nízkych hodnôt biodegradácie.

ÚROVNE ÚSPEŠNOSTI

12. Pôvodne sa požadovalo, aby primárna biodegradácia povrchovo aktívnych činidiel dosahovala úroveň 80 % alebo viac, skôr než bolo možné uviesť chemikáliu na trh. Ak sa nedosiahne hodnota 80 %, môže sa použiť tento simulačný (potvrdzujúci) test a povrchovo aktívne činidlo možno uviesť na trh, iba ak sa odstráni viac ako 90 % špecifickej chemikálie. Pri chemikáliách vo všeobecnosti nevzniká otázka úspešnej/neúspešnej úrovne a hodnota percentuálnej eliminácie sa môže použiť v približných výpočtoch pravdepodobnej koncentrácie v životnom prostredí, ktoré sa použijú v hodnotení rizika predstavovaného chemikáliami. V mnohých štúdiách čistých chemikálií sa zistilo, že percentuálna eliminácia DOC je > 90 % v prípade viac ako troch štvrtín chemikálií a > 80 % pri vyše 90 % chemikálií, ktoré vykazovali významný stupeň biodegradovateľnosti.

REFERENČNÉ CHEMIKÁLIE

13. S cieľom zabezpečiť správne vykonanie experimentálneho postupu je užitočné príležitostne testovať aj referenčné chemikálie, ktorých správanie je známe. Medzi také chemikálie patrí kyselina adipová, 2-fenylfenol, 1-naftol, kyselina 2,2-bifenyldikarboxylová a kyselina 1-naftoová.

REPRODUKOVATEĽNOSŤ VÝSLEDKOV TESTU

14. Laboratórium v Spojenom kráľovstve zistilo, že relatívna smerodajná odchýlka v rámci testov je 3,5 % a medzi testmi 5 % (7).

▼M4

OPIS METÓDY

Zariadenie

Rotujúce tubulárne reaktory

15. Zariadenie (pozri obrázky 1 a 2 v dodatku 8) pozostáva z banky z akrylových trubíc, z ktorých každá má dĺžku 30,5 cm a jej vnútorný priemer je 5 cm, podopretej kolesami s gumovým lemovaním upevnenými v kovovom podpernom ráme. Každá trubica má vonkajší okraj, s hĺbkou približne 0,5 cm, ktorým je zaistená na kolesách, vnútorný povrch je zdrsnený hrubou drôtenkou a na hornom (prívodnom) konci sa nachádza vnútorný okraj na zadržiavanie tekutiny s hĺbkou 0,5 cm. Trubice sú naklonené v uhle približne jeden stupeň k horizontálnej úrovni, aby sa zabezpečil požadovaný kontaktný čas, keď sa testovacie médium aplikuje do čistej trubice. Kolesá s gumovými pneumatikami sa otáčajú pôsobením pomalého motora s variabilnou rýchlosťou. Teplota trubíc sa kontroluje tak, že trubice sa uložia do miestnosti s konštantnou teplotou.

16. Vďaka tomu, že každý tubulárny reaktor sa vloží do mierne väčšej trubice s uzáverom a že sa zabezpečia plynotesné prepojenia, možno na účely ďalšieho merania odobrať vychádzajúci plyn CO_2 v alkalickom roztoku (6).

17. 24-hodinový prívod organického média podľa možnosti s pridanou testovanou chemikáliou do každej trubice sa nachádza v 20-litrovej zásobnej nádobe (A) (pozri obrázok 2). Ak sa to požaduje, roztok testovanej chemikálie sa môže dávkovať samostatne. V blízkosti dna každej zásobnej nádoby sa nachádza vývod, ktorý je vhodnou trubicou, napr. zo silikónového kaučuku, prostredníctvom peristaltického čerpadla (B) pripojený ku sklenej alebo akrylovej prívodnej trubici, ktorá vstupuje v rozsahu 2 – 4 cm do vyššieho (prívodného) konca naklonenej trubice (C). Výtok sa nechá odkvapkávať z nižšieho konca naklonenej trubice, aby sa zozbieral v inej zásobnej nádobe (D). Pred analýzou sa výtok usadí alebo prefiltruje.

Filtračné zariadenie – odstredivka

18. Prístroj na filtráciu vzoriek s membránovými filtrami vhodnej pórovitosti (nominálny priemer otvoru 0,45 μm), ktoré adsorbujú organické chemikálie a uvoľňujú organický uhlík v minimálnej miere. Ak sa použijú filtre, ktoré uvoľňujú organický uhlík, je potrebné dôkladne ich umyť horúcou vodou, aby sa odstránil vylúhovateľný organický uhlík. Prípadne sa môže použiť odstredivka schopná dosiahnuť 40 000 m/s^2.

19. Analytické vybavenie na stanovenie týchto parametrov:

— DOC/celkový organický uhlík (TOC) alebo chemická spotreba kyslíka (COD),

— špecifická chemikália (HPLC, GC atď.), ak sa požaduje,

— pH, teplota, kyslosť, zásaditosť,

— amónium, dusitan, dusičnan, ak sa testy vykonávajú v nitrifikačných podmienkach.

Voda

20. Voda z vodovodu s obsahom DOC nižším ako 3 mg/l.

21. Destilovaná alebo deionizovaná voda s obsahom DOC nižším ako 2 mg/l.

▼M4

Organické médium

22. Ako organické médium možno použiť syntetické médiá, domáce splaškové vody alebo zmes obidvoch. Ukázalo sa, že pri použití samotných domácich splaškových vôd často dochádza k zvýšenej percentuálnej eliminácii DOC (v jednotkách s technológiou aktivovaného kalu) a dokonca je možná biodegradácia niektorých chemikálií, ktoré nepodliehajú biodegradácii pri použití syntetických médií OECD. Preto sa odporúča používať domáce splaškové vody. Meria sa koncentrácia DOC alebo COD v každej novej dávke organického média. Je potrebné poznať kyslosť alebo zásaditosť organického média. Médium môže vyžadovať pridanie vhodného tlmivého roztoku (hydrogénuhličitan sodný alebo hydrogénfosforečnan draselný), ak má nízku kyslosť alebo zásaditosť, aby počas testu v reaktore ostalo zachované pH s hodnotou približne 7,5 ± 0,5. O množstve a čase pridania tlmivého roztoku sa rozhoduje individuálne pre každý prípad.

Syntetické médiá

23. V každom jednom litri vody z vodovodu sa rozpustí: 160 mg peptónu, 110 mg mäsového extraktu, 30 mg močoviny, 28 mg bezvodého hydrogénfosforečnanu draselného (K_2HPO_4), 7 mg chloridu sodného (NaCl), 4 mg dihydrátu chloridu vápenatého ($CaCl_2.2H_2O$), 2 mg heptahydrátu síranu horečnatého ($MgSO_4.7H_2O$). Toto syntetické médium OECD je uvedené ako príklad a zabezpečuje strednú koncentráciu DOC v prítoku v hodnote približne 100 mg/l. Môžu sa prípadne použiť iné zloženia s približne rovnakou koncentráciou DOC, ktoré sa viac približujú skutočným splaškovým vodám. Tieto syntetické médiá sa môžu pripraviť v destilovanej vode v koncentrovanej forme a až do jedného týždňa skladovať pri teplote približne 1 °C. V prípade potreby sa zriedia vodou z vodovodu. (Toto médium nie je vyhovujúce, napr. koncentrácia dusíka je veľmi vysoká, pomerne nízky obsah uhlíka, ale nebolo navrhnuté nič lepšie okrem pridania ďalšieho fosfátu ako tlmivého roztoku a ďalšieho peptónu).

Domáce splaškové vody

24. Použijú sa čerstvo usadené splaškové vody zbierané denne z čistiarní odpadových vôd, do ktorých sa dodávajú prevažne domáce splaškové vody. Mali by sa odobrať z prietokového kanála nádrže primárnej sedimentácie alebo z prívodu do čistiarne s technológiou aktivovaného kalu a mali by byť vo veľkej miere zbavené hrubých častíc. Splaškové vody sa môžu použiť po niekoľkodňovom uskladnení pri teplote približne 4 °C, ak sa preukáže, že DOC (alebo COD) sa počas uskladnenia výrazne nezníži (t. j. o menej ako 20 %). Na obmedzenie porúch systému je potrebné pred použitím upraviť DOC (alebo COD) každej novej dávky na vhodnú stálu hodnotu, napr. zriedením vodou z vodovodu.

Mazivo

25. Na mazanie valcov peristaltického čerpadla možno použiť glycerol alebo olivový olej: na trubice zo silikónového kaučuku sú vhodné obe mazivá.

Zásobné roztoky testovanej chemikálie

26. V prípade chemikálií s dostatočnou rozpustnosťou sa pripravia zásobné roztoky s vhodnými koncentráciami (napr. 1 – 5 g/l) v deionizovanej vode alebo v minerálnej časti syntetických médií. Pre nerozpustné chemikálie pozri dodatok 5 v kapitole C.10-A. Táto metóda nie je vhodná pre prchavé chemikálie bez úprav tubulárnych reaktorov (odsek 16). Určí sa DOC a TOC zásobného roztoku a merania sa opakujú pri každej novej dávke. Ak je rozdiel medzi DOC a TOC väčší ako 20 %, je potrebné skontrolovať rozpustnosť testovanej chemikálie vo vode. Porovná sa DOC alebo koncentrácia testovanej chemikálie nameraná špecifickou analýzou

▼M4

zásobného roztoku a nominálna hodnota, aby sa zistilo, či je výťažnosť dostatočná (zvyčajne možno očakávať > 90 %). Je potrebné sa uistiť, najmä pri disperziách, či sa DOC môže alebo nemôže použiť ako analytický parameter alebo či sa môže použiť iba analytická metóda špecifická pre testovanú chemikáliu. Pri disperziách sa vyžaduje odstredenie vzoriek. Pri každej novej dávke sa odmeria DOC, COD alebo testovaná chemikália pomocou špecifickej analýzy.

27. Určí sa pH zásobného roztoku. Z krajných hodnôt vyplýva, že pridanie chemikálie môže vplývať na pH aktivovaného kalu v testovacom systéme. V takom prípade je potrebné neutralizovať zásobný roztok na získanie pH 7 ± 0,5 pomocou malých množstiev anorganickej kyseliny alebo zásady, ale treba zabrániť zrážaniu testovanej chemikálie.

POSTUP

Príprava organického média na dávkovanie

28. Zabezpečí sa, aby boli všetky prítokové a výtokové nádoby a potrubia z prítokových nádob a do výtokových nádob dôkladne očistené, aby sa eliminovalo množenie mikróbov na začiatku a počas trvania testu.

29. Každý deň sa vhodným zriedením vodou z vodovodu čerstvo pripraví syntetické médium (odsek 23) buď z tuhých látok, alebo z koncentrovaného zásobného roztoku. Vo valci sa odmeria požadované množstvo, ktoré sa pridá do čistej prítokovej nádoby. V prípade potreby sa pred zriedením takisto pridá požadované množstvo zásobného roztoku testovanej chemikálie alebo referenčnej chemikálie do syntetického média. Ak je to vhodnejšie alebo potrebné na zabránenie straty testovanej chemikálie, pripraví sa zvlášť zriedený roztok testovanej chemikálie v samostatnej nádrži a pridá sa do naklonených trubíc prostredníctvom iného dávkovacieho čerpadla.

30. Prípadne (a podľa možnosti) sa použijú usadené domáce splaškové vody (odsek 24) čerstvo odobraté každý deň.

Činnosť rotujúcich tubulárnych reaktorov

31. Na hodnotenie jednej testovanej chemikálie sú potrebné dva identické tubulárne reaktory, ktoré sa umiestnia do miestnosti s konštantnou teplotou, zvyčajne 22 ± 2 °C.

32. Peristaltické čerpadlá sa nastavia tak, aby privádzali 250 ± 25 ml/h organického média (bez testovanej chemikálie) do naklonených trubíc, ktoré rotujú rýchlosťou 18 ± 2 rpm. Na trubice čerpadla sa na začiatku a pravidelne v priebehu testu aplikuje mazivo (odsek 25), aby sa zabezpečilo správne fungovanie a predĺžila sa životnosť trubíc.

33. Uhol sklonu trubíc sa prispôsobí horizontálnej úrovni, aby sa dosiahol čas zotrvania prívodu v čistej trubici 125 ± 12,5 sekúnd. Pridaním nebiologického markera (napr. NaCl, inertné farbivo) do prívodu sa odhadne retenčný čas: čas potrebný na dosiahnutie najvyššej koncentrácie vo výtoku sa použije ako stredný retenčný čas (keď je prítomný maximálny film, retenčný čas možno zvýšiť až na približne 30 min.).

34. Tieto miery, rýchlosti a časy sa určili s cieľom zabezpečiť primeranú elimináciu (> 80 %) DOC (alebo COD) a vytvoriť nitrifikované výtoky. Prietoková rýchlosť by sa mala zmeniť, ak je eliminácia nedostatočná alebo ak sa simuluje výkon konkrétnej čistiarne. V druhom prípade je potrebné prispôsobiť mieru dávkovania organického média, kým výkon reaktora nedosiahne výkon čistiarne.

▼M4

Inokulácia

35. Vzduchová inokulácia môže byť na začatie množenia mikroorganizmov dostatočná, ak sa použijú syntetické médiá, v iných prípadoch je však potrebné do prívodu pridávať 1 ml/l usadeného média počas troch dní.

Merania

36. V pravidelných intervaloch sa skontroluje, či sú miery dávok a rýchlosti rotácie v rozsahu požadovaných limitov. Takisto sa odmeria pH výtoku, najmä v prípade, že sa očakáva nitrifikácia.

Odber vzoriek a analýza

37. Metóda, spôsob a frekvencia odberu vzoriek sa zvolia tak, aby vyhovovali účelu testu. Napríklad sa zachytia vzorky prítoku a výtoku alebo sa zozbierajú vzorky v priebehu dlhšieho obdobia, napr. 3 – 6 h. V prvej fáze, bez testovanej chemikálie, sa vzorky odoberajú dvakrát týždenne. Vzorky sa filtrujú cez membrány alebo odstredivkou pri približne 40 000 m/s^2 počas približne 15 minút (odsek 18). Môže byť potrebné, aby sa vzorky pred membránovou filtráciou usadili a/alebo hrubo prefiltrovali. Určí sa DOC (alebo COD) aspoň v dvoch vyhodnoteniach a v prípade potreby BOD, amónium a dusitan/dusičnan.

38. Všetky analýzy by sa mali vykonať čo najskôr po odbere a príprave vzoriek. Ak sa analýzy musia odložiť, vzorky sa uskladnia v tme pri teplote približne 4 °C v plných, pevne uzavretých fľašiach. Ak musia byť vzorky uskladnené viac ako 48 hodín, zakonzervujú sa hlbokým zmrazením, acidifikáciou alebo pridaním vhodnej toxickej chemikálie (napr. 20 ml/l z 10 g/l roztoku chloridu ortutnatého). Je potrebné zabezpečiť, aby metóda konzervácie neovplyvnila výsledky analýzy.

Obdobie zábehu

39. V tomto období povrchový biofilm rastie, až kým nedosiahne optimálnu hrúbku, čo zvyčajne trvá približne dva týždne, ale nemalo by to trvať dlhšie ako šesť týždňov. Eliminácia (odsek 44) DOC (alebo COD) sa zvyšuje a dosiahne rovnovážnu úroveň. Keď sa dosiahne rovnováha pri podobnej hodnote v oboch trubiciach, vyberie sa jedna, ktorá bude slúžiť ako kontrolná počas zvyšku testu, v priebehu ktorého by ich výkon mal zostať konzistentný.

Zavedenie testovanej chemikálie

40. V tejto fáze sa do druhého reaktora pridá testovaná chemikália v požadovanej koncentrácii, zvyčajne 10 – 20 mg C/l. Kontrola pokračuje s cieľom získať samostatné organické médium.

Obdobie aklimatizácie

41. Dvakrát týždenne sa pokračuje v analýzach na zistenie DOC (alebo COD) a, ak sa hodnotí primárna biodegradovateľnosť, odmeria sa aj koncentrácia testovanej chemikálie prostredníctvom špecifickej analýzy. Po prvom zavedení testovanej chemikálie sa počká jeden až šesť týždňov (alebo v špeciálnych podmienkach dlhšie), aby sa umožnila aklimatizácia. Ak percentuálna eliminácia (odseky 43 – 45) dosiahne maximálnu hodnotu, získa sa 12 – 15 platných hodnôt v rovnovážnej fáze za obdobie približne troch týždňov na účely hodnotenia strednej percentuálnej eliminácie. Test sa považuje za ukončený, ak sa dosiahne dostatočne vysoký stupeň eliminácie. Po prvom pridaní testovanej chemikálie by test zvyčajne nemal trvať dlhšie ako 12 týždňov.

▼M4

Odlupovanie filmu

42. K náhlemu odstráneniu veľkých množstiev nadbytočného filmu z trubíc alebo k odlupovaniu dochádza v pomerne pravidelných intervaloch. S cieľom zabezpečiť, že to nebude mať vplyv na porovnateľnosť výsledkov, musia testy zahŕňať aspoň dva úplné cykly rastu a odlupovania.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

43. Vypočíta sa percentuálna eliminácia DOC alebo COD testovanej chemikálie pre každé časované hodnotenie pomocou rovnice:

$$D_t = 100\ [C_s - (E - E_o)]/C_s\ \%$$

kde

D_t = percentuálna eliminácia DOC (alebo COD) v čase t,

C_s = koncentrácia DOC (alebo COD) v prítoku v dôsledku testovanej chemikálie, podľa možnosti odhadnutá z koncentrácie v zásobnom roztoku a pridaného objemu zásobného roztoku (mg/l),

E = nameraná hodnota DOC (alebo COD) v testovacom výtoku v čase t (mg/l),

E_o = nameraná hodnota DOC (alebo COD) v kontrolnom výtoku v čase t (mg/l).

Výpočet sa zopakuje pri referenčnej chemikálii, pokiaľ sa testuje.

Činnosť kontrolného reaktora

44. Stupeň elimínácie DOC (alebo COD) (D_B) organického média v kontrolných reaktoroch je informácia užitočná pri hodnotení biodegradačnej činnosti biofilmu počas testu. Vypočíta sa percentuálna eliminácia z rovnice:

$$D_B = 100\ (1 - E_o/C_m)\ \%$$

kde

C_m = DOC (alebo COD) organického média v kontrolnom prítoku (mg/l).

45. Vypočíta sa eliminácia (D_{ST}) testovanej chemikálie, ak je meraná špecifickou analytickou metódou, pri každom časovom hodnotení z rovnice:

$$DST = 100\ (1 - S_e/S_i)\ \%$$

kde

S_i = nameraná alebo podľa možnosti odhadnutá koncentrácia testovanej chemikálie v testovacom prítoku (mg/l),

S_e = nameraná koncentrácia testovanej chemikálie v testovacom výtoku v čase t (mg/l).

▼M4

Ak sa analytickou metódou získaná pozitívna hodnota v neupravených splaškových vodách rovná S_c mg/l, percentuálna eliminácia (D_{SC}) sa vypočíta podľa vzorca:

$$DSC = 100\ (S_i - S_e + S_c)/(S_i + S_c)\ \%$$

Vyjadrenie výsledkov testu

46. Zakreslí sa percentuálna eliminácia D_t a D_{ST} (alebo D_{SC}), ak je k dispozícii, v závislosti od času (pozri dodatok 2 v kapitole C.10-A). Zoberie sa stredná (vyjadrená ako najbližšie celé číslo) a smerodajná odchýlka 12 – 15 hodnôt pre D_T (a pre D_{ST}, ak je k dispozícii) získaná v rovnovážnej fáze ako percentuálna eliminácia testovanej chemikálie. Z tvaru krivky eliminácie možno vyvodiť niekoľko záverov o procesoch odstraňovania.

Adsorpcia

47. Ak sa na začiatku testu pozoruje vysoká eliminácia DOC testovanej chemikálie, testovaná chemikália je pravdepodobne eliminovaná adsorpciou na biofilme. To možno dokázať určením adsorbovanej testovanej chemikálie na tuhých látkach odlúpnutých z filmu. Eliminácia DOC adsorbovateľných chemikálií zvyčajne neostáva vysoká počas celého testu. Bežne sa na začiatku vyskytne vysoký stupeň eliminácie, ktorý postupne klesá na rovnovážnu hodnotu. Ak by však adsorbovaná testovaná chemikália bola schopná spôsobiť aklimatizáciu populácie mikróbov, eliminácia DOC testovanej chemikálie by následne stúpla a dosiahla by hornú rovnovážnu úroveň.

Lag fáza

48. Podobne ako pri statických skríningových testoch si mnohé testované chemikálie vyžadujú pred úplnou biodegradáciou lag fázu. Počas lag fázy prebieha aklimatizácia alebo adaptácia príslušných baktérií pri takmer nulovej eliminácii testovanej chemikálie. Potom nastane počiatočné množenie týchto baktérií. Táto fáza sa končí a degradačná fáza sa svojvoľne začína, keď sa odstráni približne 10 % počiatočného množstva testovanej chemikálie (po umožnení adsorpcie, ak k nej dochádza). Lag fáza je často veľmi variabilná a slabo reprodukovateľná.

Rovnovážna fáza

49. Rovnovážna fáza krivky eliminácie v nepretržitom teste je vymedzená ako fáza, v ktorej nastáva maximálna degradácia. Táto fáza by mala trvať najmenej tri týždne a mala by mať približne 12 – 15 nameraných platných hodnôt.

Stredný stupeň eliminácie testovanej chemikálie

50. Vypočíta sa stredná hodnota z hodnôt eliminácie D_t (a D_{st}, ak je dostupná) testovanej chemikálie počas rovnovážnej fázy. Hodnota zaokrúhlená na celé číslo (1 %) predstavuje stupeň eliminácie testovanej chemikálie. Odporúča sa aj vypočítať 95 % interval spoľahlivosti strednej hodnoty. Podobným spôsobom sa vypočíta stredný stupeň (D_B) eliminácie organického média v kontrolnej nádobe.

▼M4

Indikácia biodegradácie

51. Ak testovaná chemikália výrazne neadsorbuje na biofilme a krivka eliminácie má typický tvar biodegradačnej krivky s lag, degradačnou a rovnovážnou fázou (odseky 48, 49), nameraná eliminácia sa môže s istotou pripísať biodegradácii. Ak bola počiatočná eliminácia vysoká, simulačný test nemôže rozlišovať medzi biologickými a abiotickými eliminačnými procesmi. V takých prípadoch a v prípade akýchkoľvek pochybností o biodegradácii (napr. ak dochádza k stripovaniu) sa vykoná analýza adsorbovanej testovanej chemikálie na vzorkách filmu alebo ďalšie statické (skríningové) testy biodegradovateľnosti založené na parametroch, ktoré jednoznačne indikujú biologické procesy. Takými testmi sú metódy absorpcie kyslíka (kapitola C.4 tejto prílohy D, E a F) (9) alebo test, v ktorom sa meria tvorba CO_2 (kapitola C.4-C tejto prílohy alebo metóda uzavretého priestoru nad kvapalinou) (10). Ako inokulum sa použije predexponovaný biofilm z príslušného reaktora.

52. Ak sa odmerala eliminácia DOC aj eliminácia špecifickej chemikálie, výrazné rozdiely (v prípade prvej hodnoty nižšej ako druhej) medzi percentuálnou elimináciou indikujú prítomnosť organických medziproduktov, ktoré sa môžu rozkladať ťažšie. Tieto medziprodukty treba preskúmať.

Platnosť výsledkov testu

53. Test možno považovať za platný, ak po dvoch týždňoch prevádzky stupeň eliminácie DOC (alebo COD) (D_B) v kontrolných jednotkách je > 80 % a nie sú pozorované žiadne nezvyčajné javy.

54. Ak sa testovala ľahko biodegradovateľná (referenčná) chemikália, stupeň biodegradácie by mal byť > 90 % a rozdiel medzi hodnotami duplikátov by nemal byť väčší ako 5 %. Ak nie sú splnené tieto dve kritériá, je potrebné skontrolovať experimentálne postupy a/alebo získať domáce splaškové vody z iného zdroja.

55. Podobne rozdiely medzi hodnotami biodegradácie z duplicitných jednotiek (ak sa použili), v ktorých sa spracúva testovaná chemikália, by sa nemali líšiť o viac ako 5 %. Ak toto kritérium nie je splnené, ale eliminácia je vysoká, v analýze sa pokračuje ďalšie tri týždne. Ak je eliminácia nízka, preskúmajú sa inhibičné účinky testovanej chemikálie, pokiaľ nie sú známe, a test sa podľa možnosti zopakuje pri nižšej koncentrácii testovanej chemikálie.

Správa o teste

56. Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— identifikačné údaje,

— fyzikálny charakter a významné fyzikálno-chemické vlastnosti.

Podmienky testovania:

— všetky modifikácie testovacieho systému, najmä ak sa testujú nerozpustné alebo prchavé látky,

— druh organického média,

— podiel a charakter priemyselného odpadu prítomného v splaškových vodách, ak sa použije a je známy,

— metóda inokulácie,

▼M4

— zásobný roztok testovanej chemikálie – obsah DOC (rozpustený organický uhlík) a TOC (celkový organický uhlík), spôsob prípravy v prípade suspendovania, použitá testovacia koncentrácia, odôvodnenie v prípade hodnôt mimo rozsahu 10 – 20 mg/l DOC, metóda pridávania, dátum prvého pridania, všetky zmeny koncentrácie,

— stredný hydraulický retenčný čas (bez rastu), rotačná rýchlosť trubice, približný uhol sklonu, ak je to možné,

— údaje o odlupovaní, čas a intenzita,

— testovacia teplota a rozsah,

— použité analytické metódy.

Výsledky testu:

— všetky namerané údaje DOC, COD, špecifické analýzy, pH, teplota, N chemikálie v prípade potreby,

— všetky vypočítané hodnoty D_t (alebo D_{tc}), D_B, D_s v tabuľkovej podobe a krivky eliminácie,

— informácie o lag a rovnovážnej fáze, trvanie testu, stupeň eliminácie testovanej chemikálie, referenčnej chemikálie (ak sa testovala) a organického média (v kontrolnej jednotke) spolu so štatistickými údajmi a vyjadreniami biodegradovateľnosti a platnosťou testu,

— rozbor výsledkov.

LITERATÚRA

1. Gerike, P., Fischer, W., Holtmann, W. (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. Wat. Res. 14: 753 – 758.

2. Truesdale, G. A., Jones, K., Vandyke, K. G. (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material.Wat. Waste Tr. J. 7: 441 – 444.

3. Baumann, U., Kuhn, G., a Benz, M. (1998) Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214 – 220.

4. Gloyna, E. F., Comstock, R. F., Renn, C. E. (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. Sewage ind. Waste 24: 1355 – 1357.

5. Kumke, G. W., Renn, C. E. (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. JAOCS 43: 92 – 94.

6. Tomlinson, T. G., Snaddon, D. H. M. (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. Int.J. Air Wat. Pollut. 10: 865 – 881.

7. Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, Londýn.

8. Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, Londýn.

9. Kapitola C.4 tejto prílohy, Stanovenie „ľahkej" biodegradovateľnosti A – F.

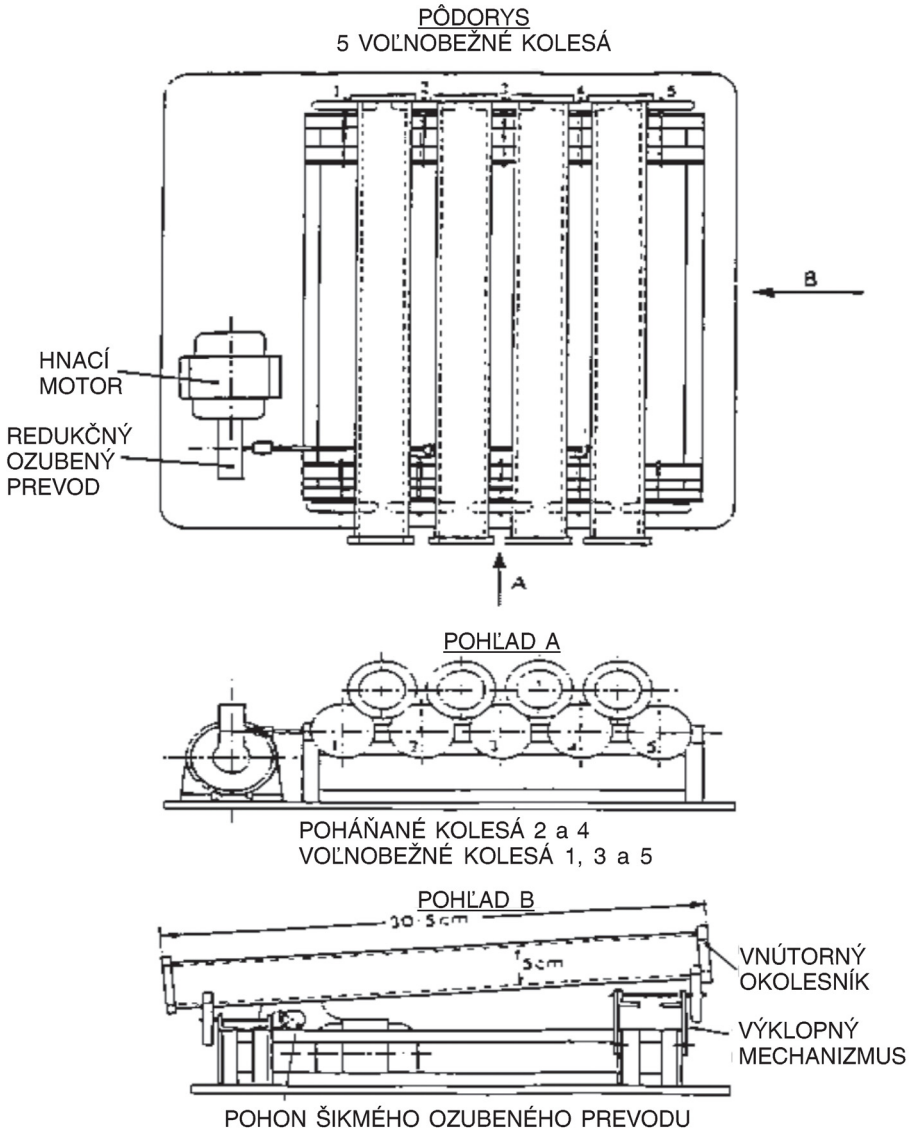
10. ISO 14593 (1998) Kvalita vody. Hodnotenie úplnej aeróbnej biodegradability organických látok vo vodnom prostredí. Metóda analýzy uvoľneného anorganického uhlíka v uzavretých nádobách.

▼**M4**

Dodatok 8

Obrázok 1

Rotujúce trubice



Glosár:

Pôdorys:

Pohľad A/B:

Poháňané kolesá:

Voľnobežné kolesá:

Hnací motor:

Redukčný ozubený prevod:

Vnútorný okolesník:

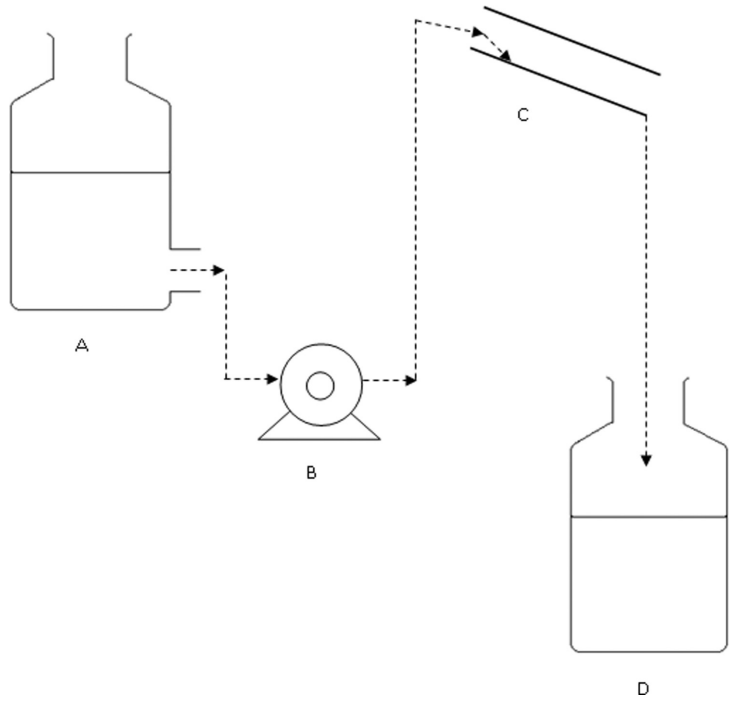
Výklopný mechanizmus:

Pohon šikmého ozubeného prevodu:

▼**M4**

Obrázok 2

Postupový diagram



A: Prívodná nádrž

B: Peristaltické čerpadlo

C: Rotujúca trubica

D: Nádoba na zber výtoku

VYMEDZENIE POJMOV:

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

Chemikálie: „Treba poznamenať, že pojem chemikálie má rozsiahle použitie v dohodách UNCED a neskorších dokumentoch na označenie látok, produktov, zmesí, prípravkov alebo akýchkoľvek iných pojmov, ktoré sa môžu používať v existujúcich systémoch, na vymedzenie rozsahu“.

▼B

C.11. 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 odporúča 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.

▼B

S cieľom vypočítať inhibičný efekt 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,

R_{c1} = miera spotreby kyslíka, kontrola 1,

R_{c2} = 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 inhibitor 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. Odporúča sa koncentrácia zásobného roztoku 0,5 g/liter, ak sa postupuje podľa popísaného protokolu.

▼B

1.6.1.2. Roztok referenčnej látky

Roztok 5,5-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_2S0_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 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.

▼B

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 kysliková 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).

▼B

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 konvenčné 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.

▼B

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} aEC_{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(84) 30 final.

▼B

C.12. **BIODEGRADÁCIA**

MODIFIKOVANÝ SCAS-TEST

1. **METÓDA**

1.1. ÚVOD

Cieľom metódy je zhodnotiť potencionálnu konečnú biodegradovateľnosť vo vode rozpustných, stabilných organických látok, ak sú vystavené účinku relatívne vysokej koncentrácie mikroorganizmov počas dlhšieho časového obdobia. Životaschopnosť mikroorganizmov je udržiavaná počas tejto doby denným pridávaním živín sedimentovaných v odpadových vodách. (Počas víkendu môžu byť odpadové vody skladované pri 4 °C, alebo sa ako alternatíva môže použiť umelé syntetické médium podľa testov schválených OECD.)

Pri interpretácii výsledkov sa musí zobrať do úvahy možnosť fyzikálno-chemickej adsorpcie pri pevných látkach v testovacom systéme (pozri 3.2.).

V dôsledku dlhej detekčnej doby kvapalnej fázy (36 hodín) a prerušovaného pridávania živín, test nesimuluje také experimentálne podmienky, aké sa docielia pri čističke odpadových vôd. Výsledky získané pri rôznych testovaných látkach indikujú vysoký biodegradačný potenciál testu.

Podmienky navodené testom sú vysoko priaznivé k selekcii a/alebo adaptácii mikroorganizmov, ktoré majú schopnosť degradovať testované látky. (Procedúra môže byť využitá aj pre prípravu aklimatizovaného inokula, ktoré je prispôsobené použitiu v ďalších testoch.)

V tejto metóde sa na stanovenie podľahnutia testovanej látky biodegradácii používa nameraná koncentrácia rozpusteného organického uhlíka (DOC). Uprednostňuje sa stanovenie rozpusteného organického uhlíka (DOC) po acidifikácii a prečistení ako rozdiel $C_{celkové} - C_{anorganické}$.

Simultánne využitie špecifických analytických metód umožňuje stanoviť primárnu degradáciu látky (nedá sa už detekovať parentálna chemická štruktúra).

Metóda je aplikovateľná len na tie organické látky, ktoré pri danej koncentrácii použitej v teste:

— sú rozpustné vo vode (aspoň 20 mg rozpusteného organického uhlíka/liter),

— majú zanedbateľný tlak nasýtených pár,

— nepôsobia inhibične na baktérie,

— nedochádza u nich k signifikantnej adsorpcii v testovacom systéme,

— nemôže pri nich dôjsť k úbytku v testovacom roztoku penením.

V materiáli použitom v teste sa musí stanoviť obsah organického uhlíka.

▼B

Pri interpretácii získaných výsledkov sú vhodné informácie o relatívnom zložení hlavných komponentov v testovacom materiáli, najmä v prípadoch nízkych alebo marginálnych hodnôt výsledkov.

Pri interpretácii nízkych hodnôt výsledkov a pri selekcii vhodných testovacích koncentrácii sú užitočné informácie o možnej toxicite testovanej látky voči mikroorganizmom.

1.2. DEFINÍCIE A JEDNOTKY

C_T = koncentrácia testovanej látky vo forme organického uhlíka, ktorý je prítomný alebo pridaný do média na začiatku prevzdušňovania (mg/liter),

C_t = koncentrácia rozpusteného organického uhlíka (DOC), zistená v teste pri ukončení prevzdušňovania (mg/liter),

C_c = koncentrácia rozpusteného organického uhlíka (DOC), zistená v kontrole testu po ukončení prevzdušňovania (mg/liter).

V tejto metóde je biodegradácia definovaná ako vymiznutie organického uhlíka. Biodegradácia môže byť vyjadrená ako:

1. Percento úbytku D_{da} z množstva látky pridanej denne:

$$D_{da} = \frac{C_t - (C_t - C_c)}{C_t} \times 100 \qquad [1]$$

kde

D_{da} = degradácia/denný prídavok.

2. Percento úbytku D_{ssd} množstva látky prítomnej na začiatku každého dňa:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \qquad [2\ (a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \qquad [2\ (b)]$$

kde

D_{ssd} = degradácia/látka na začiatku dňa,

indexy i a (i + l) sa vzťahujú na deň merania.

Vzorec 2 a) sa odporúča, ak hodnota rozpusteného organického uhlíka (DOC) v efluente lavíruje zo dňa na deň, kým vzorec 2 b) sa používa v prípade relatívne konštantnej hodnoty rozpusteného organického uhlíka (DOC) v efluente počas dní merania.

▼B

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

V určitých prípadoch, ak to výskum novej látky vyžaduje, odporúča sa využiť referenčnú látku. Žiadna konkrétna referenčná látka sa pri tomto teste neuvádza.

Údaje o niektorých látkach, vyhodnotené prostredníctvom kruhového testu, sa uvádzajú hlavne v dodatku 1, kvôli prípadnej kalibrácii metódy alebo pre porovnanie výsledkov získaných v ďalšej použitej metóde.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Aktivovaný kal z čističky odpadových vôd je umiestnený do semikontinuálnej jednotky aktivovaného kalu – SCAS jednotky. Pridá sa testovaná látka a sediment z domácich splaškových vôd a zmes sa prevzdušňuje 23 hodín. Po zastavení prevzdušňovania sa kal nechá usadiť a supernatant nad usadeninou sa odstráni.

Zostávajúci usadený kal v prevzdušňovacej komore sa zmieša s alikvótnym množstvom testovanej látky a sedimentom splaškových vôd a celý cyklus sa zopakuje.

Biodegradácia sa stanovuje určením obsahu rozpusteného organického uhlíka (DOC) v supernatante. Táto hodnota sa porovná s hodnotou získanou v kontrolnej vzorke, ktorá je tvorená len usadenými odpadovými vodami.

Pri použití špecifických analytických metód, môžu byť odmerané zmeny, ktoré nastali v koncentrácii parentálnej molekuly v dôsledku biodegradácie (primárna biodegradovateľnosť).

1.5. KRITÉRIÁ KVALITY

Reprodukovateľnosť tejto metódy založenej na úbytku rozpusteného organického uhlíka (DOC) zatiaľ nebola preukázaná. (Ak uvažujeme primárnu biodegradovateľnosť, veľmi presné údaje sa získajú pri látkach, ktoré sú degradované vo veľkom rozsahu.)

Citlivosť metódy je do veľkej miery ovplyvnená variabilitou slepého pokusu a v menšej miere presnosťou stanovenia rozpusteného organického uhlíka (DOC) a hladinou testovanej látky v počiatočnom objeme na začiatku každého cyklu.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. *Príprava*

Použije sa čistá prevzdušňovacia aparatúra vo vhodnej veľkosti alebo, ako alternatíva, zostavená pôvodná 1,5 1 SCAS jednotka s prívodovou trubicou vzduchu (obr. 1) pre každú testovanú látku a kontroly. Stlačený vzduch dodávaný do testovacích jednotiek po prečistení cez vatový filter by mal byť bez prímesi organického uhlíka a vopred saturovaný vodou, aby sa zabránilo strate vyparovaním.

Vzorka zmesi, obsahujúca 1 až 4 g suspendovanej pevnej látky/liter, sa získa z aktivovaného kalu čističky odpadových vôd spracovávajúcej domáce splaškové vody. Na jednu prevzdušňovaciu jednotku sa vyžaduje približne 150 ml tejto zmesi.

▼B

Zásobné roztoky testovanej látky sa pripravujú v destilovanej vode, pričom normálne vyžadovaná koncentrácia je 400 mg/liter vo forme organického uhlíka, z čoho vyplýva, že koncentrácia testovanej zložky na začiatku každého cyklu prevzdušňovania je 20 mg/liter vo forme uhlíka, ak nedochádza k biodegradácii.

Ak to umožňuje toxicita látky voči mikroorganizmom, môže sa použiť aj vyššia koncentrácia.

Meria sa obsah organického uhlíka v zásobnom roztoku.

1.6.2. *Podmienky testu*

Teplota pri teste sa má pohybovať v rozmedzí 20 °C až 25 °C.

Používa sa vysoká koncentrácia aeróbnych mikroorganizmov (1 g/liter až 4 g/liter suspendovanej pevnej látky) a efektívna detenčná doba je 36 hodín. Uhlíkový materiál zo živín odpadových vôd podlieha rýchlo oxidácii, v normálnych podmienkach zoxiduje po ôsmych hodinách od začiatku každého cyklu prevzdušňovania. Potom do ukončenia cyklu prevzdušňovania kal respiruje endogénne a počas tejto doby je jediným dostupným zdrojom testovaná látka, ak aj táto nie je ľahko metabolizovateľná. Tieto charakteristiky v kombinácii s každodennou inokuláciou a za použitia domácich splaškových vôd ako média poskytujú vysokovhodné podmienky pre aklimatizáciu ako aj pre vysokú mieru biodegradácie.

1.6.3. *Vykonanie testu*

Odoberie sa vzorka zmesi z kalu aktivovaného domácimi splaškovými vodami z čističky alebo laboratórnej jednotky a udržiava sa v aeróbnom stave až do jej spracovania v laboratóriu. Každá prevzdušňovacia jednotka ako aj kontrolná jednotka sa naplní 150 ml roztoku zmesi (v prípade použitia originálneho testu SCAS sa vynásobí uvedený objem desiatimi) a následne sa začne prevzdušňovať. Po 23 hodinách sa prevzdušňovanie ukončí a kal sa nechá 45 minút sedimentovať. Po otočení kohútika na každej nádobe sa odoberie 100 ml supernatantu. Vzorka sedimentu z domácich splaškových vôd sa získava tesne pred použitím a pridá sa 100 ml kalu, ktorý zostal v jednotlivých prevzdušňovači ch jednotkách. Prevzdušňovanie sa následne obnoví. V tomto štádiu sa nepridáva žiadny testovaný materiál, ale do jednotky sa dodáva denne zmes domácich splaškových vôd, až pokým sa nevytvorí po sedimentácii čistý supernatant. Tento proces zvyčajne prebieha dva týždne, počas ktorých sa približuje obsah rozpusteného organického uhlíka (DOC) v supernatante konštantnej hodnote na konci každého cyklu prevzdušňovania.

Na konci tejto periódy sa jednotlivé usadené kaly zmiešajú a 50 ml výsledného zloženého kalu sa pridá do každej jednotky.

Do kontrolnej jednotky sa pridá 95 ml sedimentu z odpadových vôd a 5 ml vody, do testovacích jednotiek sa pridá 95 ml sedimentu z odpadových vôd a 5 ml z vhodného zásobného roztoku testovanej látky (400 mg/liter). Znovu sa začne s prevzdušňovaním počas nasledujúcich 23 hodín. Kal sa nechá sedimentovať 45 minút, supernatant sa odoberie a analyzuje sa obsah rozpusteného organického uhlíka (DOC).

Opísaný postup pridávania a odberov sa prevedie denne počas celého trvania testu.

▼B

Pred sedimentáciou je potrebné očistiť steny prevzdušňovacej jednotky, aby sa zabránilo akumulácii pevných častíc nad hladinou kvapaliny. V každej jednotke sa musí použiť iná škrabka alebo kefka, aby nedošlo ku prenosu kontaminácie medzi jednotkami.

V ideálnom prípade sa stanovuje obsah rozpusteného organického uhlíka (DOC) v supernatante denne, ale prípustné sú aj menej frekventované analýzy. Pred samotnou analýzou sa supernatant filtruje cez premyté 0,45 um membránové filtre alebo sa scentrifuguje. Membránové filtre sú prípustné, ak je potvrdené, že sa z nich neuvoľňuje uhlík, alebo že nevyvolávajú adsorpciu pevných častíc počas filtrácie. Teplota vzorky počas centrifugácie nesmie presiahnuť 40 °C.

Dĺžka trvania testu pri látkach, ktoré vykazujú len malú alebo žiadnu biodegradáciu, nie je určená, ale skúsenosti naznačujú, že by to malo byť vo všeobecnosti aspoň 12 týždňov, ale nie dlhšie ako 26 týždňov.

2. **ÚDAJE A PLATNOSŤ**

Zistené hodnoty rozpusteného organického uhlíka (DOC) v supernatante testovacích aj kontrolných jednotiek sa vynesú do grafov v závislosti od času.

Pri dosiahnutí biodegradácie sa výsledky zistené v teste začnú približovať kontrolným výsledkom. Ak je v troch nasledujúcich meraniach zistený konštantný rozdiel medzi testovacími a kontrolnými jednotkami, vykoná sa už len taký počet meraní, aby bolo možné údaje štatisticky spracovať a vypočítať percento biodegradácie testovanej látky alebo prípravku (D_{da} alebo D_{ssd}, pozri odsek 1.2).

3. **SPRÁVA**

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí, ak je to možné, obsahovať tieto informácie:

— všetky informácie o type odpadových vôd, type použitých jednotiek, o experimentálnych výsledkoch zahŕňajúcich testovanú látku, referenčnú látku, ak bola použitá a slepú vzorku,

— teplotu,

— úbytkovú krivku aj s opisom, spôsob výpočtu (pozri 1.2),

— dátum a lokalita, kde boli odobraté vzorky aktivovaného kalu a odpadovej vody, stav adaptácie, koncentrácie atď.,

— vedecké odôvodnenie akýchkoľvek zmien v testovacej metóde,

— podpis a dátum.

▼B

3.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Keďže látka testovaná danou metódou zvyčajne nie je ľahko biodegradovateľná, normálny úbytok organického uhlíka v dôsledku samotnej biodegradácie bude v priebehu dní až týždňov postupný, okrem tých prípadov, keď dôjde k náhlej aklimatizácii sprevádzanej rapídnym vymiznutím uhlíka po niekoľkých týždňoch.

Významnú úlohu zohráva však v niektorých prípadoch 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.

▼B

Dodatok 1

Test SCAS: príklad výsledkov

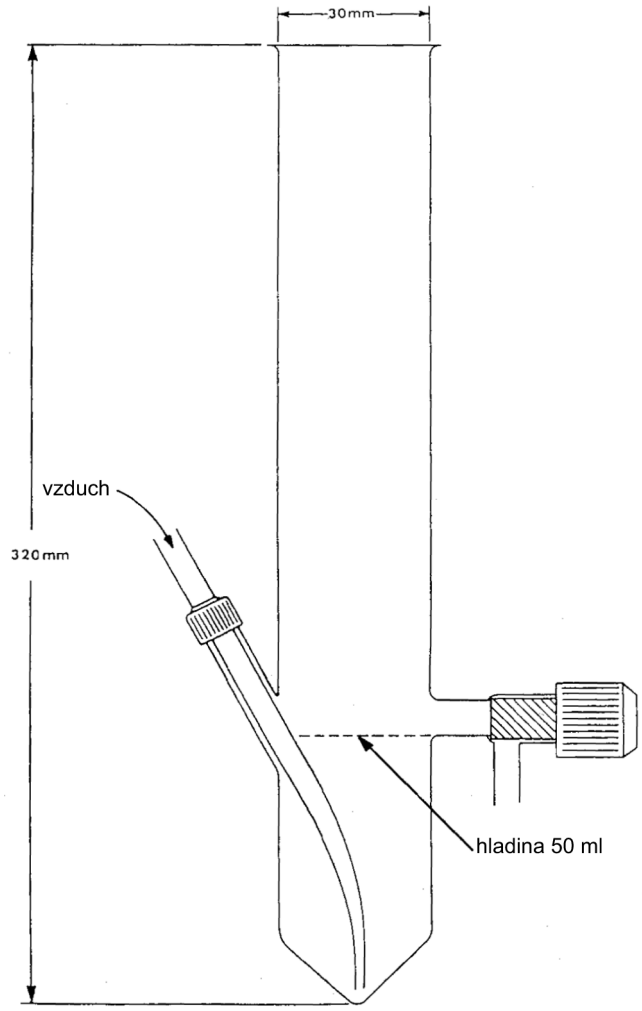
Látka	C_T (mg/l)	$C_t - C_c$ (mg/l)	% biodegradácie (D_{ds})	Trvanie testu (dni)
4-acetyl aminobenzén sulfonát	17,2	2,0	85	40
tetrapropylénbenzén sulfonát	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenol	16,9	0,8	95,3	40
dietylénglykol	16,5	0,2	98,8	40
anilín	16,9	1,7	95,9	40
cyklopentan tetrakarboxylát	17,9	3,2	81,1	120

▼B

Dodatok 2

Príklad testovacieho prístroja

Obrázok č. 1



▼B

C.13 BIOKONCENTRÁCIA: PRIETOKOVÝ RYBÍ TEST

1. METÓDA

Táto metóda je prevzatá z OECD TG 305 (1996).

1.1. ÚVOD

Táto metóda opisuje postup, ktorý sa používa na charakterizáciu potenciálu látok na biokoncentrovanie v rybách pri prietočných podmienkach. Prednosť sa dáva prietočným testovacím režimom, no pod podmienkou spĺňania kritérií platnosti možno použiť aj poloprietočné režimy.

Metóda poskytuje dostatok podrobností na uskutočnenie testu a súčasne poskytuje primeranú voľnosť na prispôsobenie pokusného usporiadania podmienkam jednotlivých laboratórií a rozličným charakteristikám testovaných látok. Najplatnejším spôsobom ju možno použiť pri stálych organických chemických zlúčeninách s hodnotami log P_{ow} medzi 1,5 a 6,0 (1), no dá sa ešte použiť aj pre superlipofilné látky (s hodnotou P_{ow} > 6,0). Predbežne odhadnutá hodnota biokoncentračného faktora (BCF), ktorý sa niekedy označuje ako K_B, týchto superlipofilných látok bude pravdepodobne vyššia ako hodnota rovnovážneho biokoncentračného faktora (BCF_{SS}), ktorú možno dosiahnuť v laboratórnych pokusoch. Predbežné odhady biokoncentračného faktora organických látok s hodnotami log Pow do 9,0 možno získať pomocou rovnice Bintena a spol. (2). Medzi parametre, ktoré charakterizujú biokoncentračný potenciál, patria vychytávacia konštanta/konštanta rýchlosti vychytávania (k_1), konštanta rýchlosti depurácie/vylučovania (k_2) a BCF_{SS}.

Analyzovanie vzoriek vody i rýb uľahčuje použitie rádioaktívne označených látok, na základe ktorých sa dá overiť, či treba uskutočniť identifikáciu a kvantifikáciu degradačných produktov. Pri meraní celkových rádioaktívnych zvyškov (napríklad spaľovaním alebo solubilizáciou tkanív) je BCF založené na materskej látke, všetkých jej metabolitoch zadržaných v organizme a tiež na asimilovanom uhlíku. Hodnoty BCF, ktoré sú založené na celkovom množstve rádioaktívnych zvyškov, preto nemožno priamo porovnávať s hodnotami BCF získanými pomocou špecifickej chemickej analýzy iba materskej látky.

Na stanovenie BCF založeného iba na materskej látke možno v štúdiách s rádioaktívne označenými látkami použiť čistiace postupy a v prípade potreby možno stanovovať najvýznamnejšie metabolity. Je tiež možná kombinácia rybej metabolickej štúdie a biokoncentračnej štúdie, pri ktorej sa analyzujú a identifikujú metabolity v tkanivách.

1.2. DEFINÍCIE A JEDNOTKY

Biokoncentrácia/bioakumulácia je zvyšovanie koncentrácie testovanej látky v alebo na organizme (jeho určenom tkanive) vzhľadom na jej koncentráciu v okolitom prostredí.

Biokoncentračný faktor (BCF alebo K_{SB}) v ktoromkoľvek čase počas vychytávacej fázy tohto akumulačného testu predstavuje koncentráciu testovanej látky v/na rybe alebo jej určenom tkanive [C_f ako µg/g (ppm)], vydelenú koncentráciou tejto látky v okolitom prostredí [C_w ako [µg/ml (ppm)].

▼B

Rovnovážny biokoncentračný faktor (BCF_{SS} alebo K_B) sa počas dlhého časového obdobia významne nemení, koncentrácia testovanej látky v okolitom prostredí je počas tohto obdobia stála.

Plató alebo rovnovážny stav nastáva pri grafickom znázornení závislosti obsahu testovanej látky v rybe (C_f) od času vtedy, keď sa priebeh krivky stáva paralelný s časovou osou a tri po sebe idúce analýzy C_f, uskutočnené na vzorkách odobratých minimálne v dvojdňových intervaloch, sa od seba neodlišujú o viac ako ± 20 % a ak počas týchto troch odberov vzoriek nedochádza k žiadnym významným zmenám. Pri analyzovaní spájaných vzoriek je potrebné vykonať najmenej štyri bezprostredne za sebou idúce analýzy. Pri pomaly sa vychytávajúcich látkach je primeranejší interval sedem dní.

Biokoncentračné faktory vypočítané priamo z kinetických konštánt (k_1/k_2) sa nazývajú kinetický koncentračný faktor (BCF_K).

Rozdeľovací koeficient oktanol-voda (P_{ow}) je pomer rozpustnosti chemickej zlúčeniny v n-oktanole a vo vode pri rovnovážnych podmienkach (metóda A.8), tiež označovaný ako K_{ow}. Dekadický logaritmus veličiny P_{ow} sa používa na vyjadrenie potenciálu chemickej látky na biokoncentráciu vo vodných živočíchoch.

Expozičná alebo vychytávacia fáza je čas, počas ktorého sú ryby vystavené testovanej chemickej látke.

Rýchlostná konštanta vychytávania (k_1) je číselná hodnota, ktorá definuje rýchlosť zvyšovania koncentrácie testovanej látky v/na testovaných rybách (alebo ich určenom tkanive), keď sú ryby vystavené jej prítomnosti (k_1 sa vyjadruje ako deň$^{-1}$).

Poexpozičná alebo depuračná (vylučovacia) fáza je čas, ktorý nasleduje po premiestnení testovaných rýb z prostredia obsahujúceho testovanú látku do média, v ktorom táto látka nie je prítomná a počas ktorého sa skúma depurácia (alebo čisté vylučovanie) látky z testovacích rýb (alebo z ich určených tkanív).

Rýchlostná konštanta depurácie (vylučovania) (k_2) je číselná hodnota definujúca rýchlosť znižovania koncentrácie testovanej látky v testovacích rybách (alebo ich určených tkanivách) po premiestnení testovacích rýb z média obsahujúceho testovanú látku do média, ktoré túto látku neobsahuje (k_2 sa vyjadruje ako deň$^{-1}$).

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Test pozostáva z dvoch fáz, t. j. z expozičnej (vychytávacej) a poexpozičnej (depuračnej) fázy. Počas vychytávacej fázy sa dve oddelené skupiny jedného druhu rýb vystavujú najmenej dvom koncentráciám testovanej látky. Potom sa premiestnia do prostredia, ktoré testovanú látku neobsahuje, a začne prebiehať depuračná fáza. Okrem prípadov, v ktorých dochádza počas vychytávacej fázy iba k nevýznamnému vychytávaniu testovanej látky (t. j. hodnota BCF je nižšia ako 10), je depuračná fáza vždy potrebná. Počas oboch fáz testu sa sleduje koncentrácia testovanej látky v/na rybách (alebo ich určených tkanivách). Okrem dvoch testovaných koncentrácií sa kontrolná skupina rýb vystavuje prostrediu s úplne identickými podmienkami, ktoré však neobsahuje testovanú látku. Účelom tejto skupiny je vztiahnutie možných nepriaznivých účinkov pozorovaných počas biokoncentračného testu na príslušné kontroly a získanie koncentrácie testovanej látky v pozadí.

▼B

S výnimkou prípadov, v ktorých sa preukáže dosiahnutie rovnovážneho stavu skôr, trvá vychytávacia fáza 28 dní. Predpovedanie dĺžky vychytávacej fázy potrebnej na dosiahnutie rovnovážneho stavu možno uskutočniť na základe rovnice, ktorá je uvedená v dodatku 3. Depuračná fáza sa začne premiestnením rýb do čistej nádrže s úplne rovnakým prostredím, ktoré však neobsahuje testovanú látku. Vždy keď je to možné, sa biokoncentračný faktor prednostne vypočíta ako pomer (BCF_{SS}) koncentrácie testovanej látky v rybách (C_f) a vo vode (C_w) pri zjavnom rovnovážnom stave a tiež ako kinetický biokoncentračný faktor (BCF_K), ako pomer rýchlostných konštánt vychytávania (k_1) a depurácie (k_2) za predpokladu, že proces sa riadi kinetikou prvého poriadku. V prípadoch, v ktorých sa proces zjavne neriadi kinetikou prvého poriadku, treba použiť komplexnejšie modely (dodatok 5).

Ak sa rovnovážny stav nedosiahne do 28 dní, potom je potrebné pokračovať vo vychytávacej fáze až do jeho dosiahnutia alebo počas 60 dní podľa toho, čo nastane prv. Potom sa začína depuračná fáza.

Na základe modelu, ktorý najlepšie opisuje namerané koncentrácie testovanej látky v rybách a vo vode, sa vypočíta rýchlostná konštanta vychytávania, rýchlostná koncentrácia depurácie (vylučovania) (alebo rýchlostné konštanty v prípade komplexnejších modelov), biokoncentračný faktor a tam, kde je to možné, aj intervaly spoľahlivosti každého z týchto parametrov.

BCF sa vyjadruje ako funkcia celkovej vlhkej hmotnosti rýb. Z osobitných dôvodov sa však môžu v prípadoch dostatočnej veľkosti rýb niekedy použiť určené tkanivá alebo orgány (napríklad sval, pečeň), alebo sa môžu ryby rozdeliť na jedlé (rezy/filety) alebo nejedlé časti (vnútornosti). Pretože pri mnohých organických látkach sa pozoruje jasná súvislosť medzi ich biokoncentračným potenciálom a lipofilitou, existuje tiež príslušná súvislosť medzi obsahom tuku v testovaných rybách a pozorovanou biokoncentráciou týchto látok. V záujme znižovania takéhoto zdroja variability výsledkov testovania by sa pri veľmi lipofilných látkach (t. j. ak je ich log P_{ow} > 3) mala biokoncentrácia vyjadrovať okrem celkovej telesnej hmotnosti rýb aj na obsah tuku.

Ak je to možné, obsah tuku by sa mal stanovovať v rovnakom biologickom materiáli, ktorý sa použil na stanovenie koncentrácie testovanej látky.

1.4. INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

Pred uskutočnením testu na zisťovanie biokoncentrácie treba mať k dispozícii tieto informácie o testovanej látke:

— rozpustnosť vo vode,

— rozdeľovací koeficient oktanol-voda P_{ow} (označovaný aj ako K_{ow}, stanovený pomocou metódy HPLC uvedenej v A.8),

— hydrolýzu,

— fototransformáciu vo vode, stanovenú pri slnečnom alebo simulovanom slnečnom svetle a pri takých svetelných podmienkach, pri akých sa bude uskutočňovať test na stanovenie biokoncentrácie (3),

▼B

— povrchové napätie (t. j. pri látkach, pri ktorých nemožno stanoviť log P_{ow}),

— tlak nasýtených pár,

— okamžitú biodegradáciu (ak je to potrebné).

Medzi ďalšie požadované informácie patrí toxicita pre druh rýb použitý v teste, podľa možnosti vyjadrená ako asymptotická LC_{50} (t. j. nezávislá od času). Na kvantifikáciu testovanej látky v testovaných roztokoch a v biologickom materiáli musí byť k dispozícii primeraná analytická metóda so známou presnosťou a spoľahlivosťou. Musia byť známe aj údaje o príprave a skladovaní vzorky. Treba tiež poznať analytický prah detekcie testovanej látky vo vode a v rybích tkanivách. Pri používaní testovaných látok označených uhlíkom^{14} C treba poznať aj percentuálne zastúpenie rádioaktivity spojenej s nečistotami/prímesami.

1.5. PLATNOSŤ TESTU

Aby bol test platný, musia byť dodržané tieto podmienky:

— výkyvy teploty menšie ako ± 2 °C,

— koncentrácia rozpusteného kyslíka nesmie klesnúť pod 60 % saturácie,

— koncentrácia testovanej látky v komorách sa musí udržiavať v rozmedzí ± 20 % priemeru hodnôt nameraných počas vychytávacej fázy,

— úhyn alebo iné nepriaznivé vplyvy/choroby sú na konci testu u testovaných aj kontrolných rýb nižšie ako 10 %; pri trvaní testu počas niekoľkých týždňov alebo mesiacov musí byť úhyn alebo iné nepriaznivé javy nižší ako 5 % za týždeň a celkovo nesmie presiahnuť 30 %.

1.6. REFERENČNÉ ZLÚČENINY

V prípade potreby možno experimentálne postupy overiť pomocou referenčných zlúčenín so známym biokoncentračným potenciálom. Nemožno však zatiaľ odporúčať žiadne konkrétne látky.

1.7. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.7.1. *Prístrojové vybavenie*

Pri všetkých súčastiach zariadení sa treba vyhýbať používaniu materiálov, ktoré sa môžu rozpúšťať, absorbovať a vylúhovávať a ktoré môžu mať na ryby nepriaznivé účinky. Možno používať bežné nádrže pravouhlého alebo valcovitého tvaru z vhodného materiálu a takej veľkosti, ktorá zodpovedá veľkosti násady rýb. Pokiaľ možno, treba sa vyhýbať používaniu hadičiek a rúrok z mäkkých plastických látok. Prednostne treba používať hadičky, rúrky vyrobené z teflónu®, nehrdzavejúcej ocele alebo skla. Zo skúseností vyplýva, že pri látkach s vysokým absorpčným koeficientom (napríklad pri syntetických pyretroidoch) môže byť potrebné používať posilanizované sklo. V takýchto prípadoch je potrebné zariadenia po skončení pokusu zlikvidovať.

▼B

1.7.2. *Voda*

Pri testoch sa vo všeobecnosti používa prírodná voda, ktorá musí byť získavaná z nekontaminovaných zdrojov s jednotnou kvalitou. Riediaca voda musí mať takú kvalitu, aby umožnila prežívanie zvoleného druhu rýb počas celého obdobia aklimatizácie a testovania bez toho, aby sa pri nich prejavil nezvyčajný vzhľad alebo správanie. V ideálnom prípade treba preukázať, že testovaný druh dokáže vo vode používanej na riedenie prežívať, rásť a rozmnožovať sa (napríklad pomocou testu v laboratórnej kultúre alebo testu toxicity pre životný cyklus). Vodu treba charakterizovať najmenej z hľadiska pH, tvrdosti, celkového obsahu tuhých látok a organicky viazaného uhlíka a pokiaľ možno tiež obsahu amoniaku, dusitanov a alkalitov a pri morských druhoch aj z hľadiska slanosti. Hoci sú parametre, ktoré sú potrebné na zaručenie optimálneho blahobytu rýb, dobre známe, v dodatku 1 sú uvedené odporúčané maximálne koncentrácie celého radu parametrov charakterizujúcich sladkú aj morskú vodu.

Voda musí mať počas celého trvania testu stálu kvalitu. Hodnota pH by sa mala pohybovať v rozmedzí 6,0 až 8,5, no počas daného testu by nemala kolísať o viac ako ± 0,5 jednotiek pH. Aby voda neovplyvňovala neprimeraným spôsobom výsledky testovania (napríklad vznikaním komplexov testovanej látky) alebo aby nemal nepriaznivý vplyv na násadu testovacích rýb, je potrebné zabezpečiť v pravidelných intervaloch odber vzoriek na analýzu. Ak je známe, že voda má relatívne stálu kvalitu, stačí, ak sa v nej bude napríklad raz za každé tri mesiace stanovovať obsah ťažkých kovov (napríklad Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), hlavných aniónov a katiónov (napríklad Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4), pesticídov (napríklad celkové organofosforečné a organochloridové pesticídy), celkového organicky viazaného uhlíka a rozsuspendovaných tuhých častíc. Ak si voda preukázateľne zachováva stálu kvalitu počas najmenej jedného roka, potom možno vykonávať tieto stanovenia menej často (napríklad každých šesť mesiacov).

Obsah prirodzených tuhých častíc aj celkového organicky viazaného uhlíka by mal byť v riediacej vode čo možno najnižší, aby sa zabránilo absorpcii testovanej látky na organickú hmotu, v dôsledku čoho by sa mohla znížiť jej biologická dostupnosť (4). Maximálny prípustný obsah tuhých častíc je 5 mg/l (suchá hmotnosť, neprechádzajúca cez 0,45 μm filter) a celkového organicky viazaného uhlíka 2 mg/l (pozri dodatok 1). V prípade potreby treba vodu pred použitím filtrovať. Príspevok testovacích rýb (exkrementy) a zvyškov krmiva k obsahu organicky viazaného uhlíka vo vode by mal byť čo možno najnižší. Koncentrácia organicky viazaného uhlíka v testovacej nádrži by nemala počas celého trvania testu prekročiť koncentráciu organicky viazaného uhlíka, pochádzajúcu z testovanej látky, prípadne použitého solubilizačného činidla, o viac ako 10 mg/l (± 20 %).

1.7.3. *Testovacie roztoky*

Pripraví sa zásobný roztok testovanej látky s vhodnou koncentráciou. Zásobný roztok treba podľa možnosti pripraviť jednoduchým zmiešaním alebo trepaním testovanej látky v rozpúšťacej vode. Použitie rozpúšťadiel alebo disperzných činidiel (rozpúšťajúcich činidiel) sa neodporúča, hoci v niektorých prípadoch to môže byť v záujme prípravy zásobného roztoku s vhodnou koncentráciou potrebné. Medzi rozpúšťadlá, ktoré možno použiť, patrí etanol, metanol, etylénglykol, momometyléter, etylénglykoldimetyléter, dimetylformamid a trietylénglykol. Ako disperzné činidlá možno použiť Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % metylcelulózu a HCO-40. Činidlá, ktoré ľahko podliehajú biodegradácii, treba používať s opatrnosťou, pretože môžu v prietokových testoch spôsobovať problémy s rastom baktérií. Testovanú látku možno označiť rádioaktívnym izotopom a musí mať najvyššiu možnú čistotu (napríklad podľa možnosti > 98 %).

▼B

Pri prietočných testoch je potrebný systém pre nepretržitý prívod a zrieďovanie zásobného roztoku testovanej látky (napríklad dávkovacie čerpadlo, úmerný dávkovač, saturátorový systém), ktorým sa zabezpečuje jej prívod do testovacích komôr. Objem každej testovacej komory by sa mal denne vymeniť aspoň päťkrát. Treba uprednostniť prietočný systém, hoci tam, kde to nie je možné (malo by to napríklad nepriaznivý vplyv na testovací organizmus) sa môžu pod podmienkou splnenia kritérií validity použiť aj poloprietočné usporiadania. Prietokovú rýchlosť zásobného roztoku aj zrieďovacej vody je potrebné skontrolovať 48 hodín pred začatím pokusu a potom najmenej raz denne počas celého jeho trvania. Treba pri tom kontrolovať aj rýchlosť prietoku cez každú testovaciu komoru a zabezpečiť, aby výkyvy prietoku v rámci komôr i medzi nimi nepresahovali 20 %.

1.7.4. *Voľba biologických druhov*

Pri voľbe biologických druhov sa treba riadiť týmito kritériami: musia byť ľahko dostupné, možno ich získať vo výhodnej veľkosti a možno ich uspokojivo udržiavať v laboratóriu. Ako ďalšie kritériá pri voľbe vhodných druhov rýb treba brať do úvahy ich rekreačný, komerčný a ekologický význam, ako aj ich pomernú citlivosť, úspešnosť použitia v minulosti a podobne.

Odporúčané testovacie druhy sú uvedené v dodatku 2. Možno použiť aj iné druhy, postup testovania však treba upraviť tak, aby sa dosiahli vhodné testovacie podmienky. Použitie daného druhu a pokusnej metódy treba v takomto prípade odôvodniť.

1.7.5. *Uchovávanie rýb*

Aklimatizujte zásobnú populáciu rýb najmenej dva týždne vo vode a pri testovacej teplote. Počas celej aklimatizácie ich kŕmte dostatočným množstvom stravy, ktorá sa bude používať aj počas pokusu.

Po 48-hodinovej privykacej-adaptačnej fáze sa zaznamená úhyn a uplatnia sa tieto selekčné kritériá:

— úhyn za sedem dní prevyšuje 10 % celej populácie: celá násada sa vyradí,

— úhyn za sedem dní je medzi 5 a 10 % populácie: aklimatizovať ďalších sedem dní,

— úhyn za sedem dní je nižší ako 5 % populácie: násadu možno použiť; ak je úhyn počas ďalších siedmich dní vyšší ako 5 %, celá násada sa vyradí.

Treba zabezpečiť, aby boli použité testovacie ryby bez zjavných chorôb a abnormalít. Všetky choré ryby treba z pokusu vyradiť. Dva týždne pred testom ani počas jeho trvania nesmú byť ryby ošetrované proti ochoreniam.

▼B

1.8. PRIEBEH TESTU

1.8.1. *Predbežná skúška*

V záujme optimalizácie podmienok hlavného testovania môže byť užitočné vykonať predbežný pokus zameraný napríklad na voľbu koncentrácie/koncentrácií testovanej látky a trvanie vychytávacej a depuračnej fázy.

1.8.2. *Podmienky vystavenia testovanej látke*

1.8.2.1. Trvanie vychytávacej fázy

Trvanie vychytávacej fázy možno predpovedať na základe praktických skúseností (napríklad na základe predchádzajúcej štúdie alebo znalosti o akumulácii príbuznej látky) alebo na základe istých empirických vzťahov vychádzajúcich buď z rozpustnosti danej látky vo vode, alebo z jej rozdeľovacieho koeficientu v systéme oktanol/voda (pozri dodatok 3).

Okrem prípadov, v ktorých nastane rovnovážny stav preukázateľne skôr, by mala vychytávacia fáza trvať 28 dní. Ak sa rovnovážny stav do 28 dní nedosiahne, potom treba vychytávaciu fázu a analyzovanie vzoriek predĺžiť buď do jeho dosiahnutia, alebo na 60 dní, podľa toho, čo nastane skôr.

1.8.2.2. Trvanie depuračnej fázy

Na dosiahnutie dostatočného odstránenia (napríklad 95 %) testovanej látky z tela zvyčajne stačí polovičný čas trvania vychytávacej fázy (tento odhad je vysvetlený v dodatku 3). Ak je čas potrebný na 95 % odstránenie testovanej látky z praktického hľadiska pridlhý a je napríklad dva razy dlhší ako trvanie vychytávacej fázy (t. j. viac ako 56 dní), potom možno použiť kratšie obdobie (napríklad kým koncentrácia testovanej látky nebude nižšia ako 10 % rovnovážnej koncentrácie). V prípade látok, ktorých vychytávame a depurácia sa riadia zložitejším priebehom ako pri jednokomorovom rybom modeli s kinetikou prvého poriadku, treba použiť na stanovenie rýchlostnej konštanty depurácie dlhšie obdobie. Podmienkou však je, aby bola koncentrácia testovanej látky počas takéhoto predĺženého obdobia vždy vyššia, ako je prah analytickej detekcie.

1.8.2.3. Počty testovacích rýb

Počet testovacích rýb na testovanú koncentráciu voľte tak, aby boli pri každom odbere vzoriek k dispozícii najmenej štyri kusy na jedno meranie. V prípade potreby vyššej štatistickej sily treba na jednu vzorku viac rýb.

V prípade použitia dospelých rýb zaznamenajte, či sa pokus vykonáva na samčekoch, alebo samičkách, alebo na oboch pohlaviach. Pri používaní oboch pohlaví treba ešte pred začatím testovania zdokumentovať, že rozdiel v obsahu tuku medzi nimi nie je významný. Môže byť potrebné spájanie všetkých samčekov i samičiek.

▼B

Pri každom odbere vzoriek treba vyberať ryby podobnej veľkosti, tak aby najmenšie z nich neboli menšie ako dve tretiny hmotnosti najväčších. Všetky musia byť z rovnakého roka a musia pochádzať z toho istého zdroja. Vek a hmotnosť majú podľa všetkého niekedy na hodnoty BCF významný vplyv (1), a preto je potrebné tieto údaje presne zaznamenávať. Odporúča sa, aby sa priemerná hmotnosť rýb zistila pomocou odváženia subpopulácie rýb ešte pred uskutočnením testovania.

1.8.2.4. Veľkosť násady

Používa sa vysoký pomer vody k rybám, aby sa minimalizovalo znižovanie C_w spôsobené pridaním rýb na začiatku pokusu a aby sa zabránilo znižovaniu koncentrácie rozpusteného kyslíka. Je dôležité, aby veľkosť násady zodpovedala použitému druhu rýb. V každom prípade sa však odporúča zvyčajná veľkosť násady v rozmedzí 0,1 do 1,0 g rýb (vlhká hmotnosť) na liter vody a deň. Možno použiť aj vyššie násady, treba však zabezpečiť udržiavanie požadovanej koncentrácie testovanej látky v rozmedzí povolených výkyvov ± 20 % a koncentrácia rozpusteného kyslíka nesmie klesnúť pod 60 % saturácie.

Pri voľbe primeraných režimov nasadzovania treba brať do úvahy bežné prirodzené prostredie daného druhu. Napríklad ryby žijúce pri dne si môžu vyžadovať väčšiu plochu dna nádrže pri rovnakom objeme vody ako druhy žijúce pri hladine.

1.8.2.5. Kŕmenie

Počas aklimatizačnej aj testovacej fázy sa ryby kŕmia primeranou stravou so známym obsahom tukov a celkových bielkovín v množstve dostatočnom na udržiavanie rýb v dobrom zdravotnom stave a na priberanie telesnej hmotnosti. Počas aklimatizačnej aj testovacej fázy sa ryby kŕmia denne množstvom, ktoré zodpovedá približne 1 až 2 % telesnej hmotnosti. Takýto režim kŕmenia zabezpečí počas celého testu relatívne stálu koncentráciu lipidov. Množstvo krmiva treba pravidelne prepočítavať, napríklad raz týždenne, aby sa zabezpečila jednotná telesná hmotnosť aj obsah tukov. Na účely takéhoto výpočtu možno hmotnosť rýb nachádzajúcich sa v testovacej komore odhadnúť na základe hmotnosti rýb odobratých z danej komory pri poslednom odbere vzoriek. Ryby, ktoré zostávajú v pokusnej komore, sa nesmú vážiť.

Neskonzumované krmivo aj výkaly sa z testovacej komory denne odsávajú, a to krátko po skončení kŕmenia (do pol až jednej hodiny). Testovacie komory treba počas celého testovacieho obdobia udržiavať v čo možno najčistejšom stave, aby sa na čo možno najnižšiu úroveň znižovala aj koncentrácia organickej hmoty. Prítomnosť organicky viazaného uhlíka totiž môže obmedzovať biologickú dostupnosť testovanej látky (1).

Mnohé krmivá obsahujú rybaciu múčku, krmivo je preto potrebné analyzovať na prítomnosť testovanej látky. Je žiaduce, aby sa v krmive stanovoval aj obsah pesticídov a ťažkých kovov.

▼B

1.8.2.6. Svetlo a teplota

Dĺžka fotoperiódy je zvyčajne 12 až 16 hodín a teplota (± 2 °C) by mala byť primeraná druhu testovacích rýb (dodatok 2). Musí byť známy typ osvetlenia a jeho charakteristiky. Treba zachovávať opatrnosť z hľadiska možnosti fototransformácie testovanej látky pod vplyvom svetelných podmienok štúdie. Treba udržiavať primerané osvetlenie, aby sa ryby nevystavovali účinkom neprirodzených fotoproduktov. V niektorých prípadoch môže byť potrebné používať filtre na elimináciu ultrafialového žiarenia s vlnovou dĺžkou nižšou ako 290 nm.

1.8.2.7. Testované koncentrácie

Ryby sa v prietočných podmienkach vystavujú najmenej dvom koncentráciám testovanej látky vo vode. Vyššia (alebo najvyššia) koncentrácia testovanej látky sa zvyčajne volí tak, aby predstavovala približne 1 % jej akútnej asymptotickej LC_{50} a aby bola najmenej desať ráz vyššia ako jej prah detegovateľnosti pomocou používanej analytickej metódy.

Najvyššiu testovanú koncentráciu tiež možno stanoviť vydelením hodnoty akútnej 96-hodinovej LC_{50} príslušným pomerom akútnej/-chronickej koncentrácie (príslušné pomery sa môžu pri niektorých chemikáliách pohybovať od 3 to 100). Ak je to možné, druhú (prípadne ďalšie) z testovaných koncentrácií treba voliť tak, aby sa od prvej odlišovala/odlišovali o faktor 10. Ak to z dôvodu kritéria 1 % hodnoty LC_{50} alebo analytického prahu nie je možné, potom možno použiť faktor nižší ako 10 alebo treba uvažovať o označení testovanej látky izotopom ^{14}C. Nesmú sa používať koncentrácie, ktoré sú vyššie ako rozpustnosť testovanej látky.

V prípade použitia solubilizačného činidla nesmie byť jeho koncentrácia vyššia ako 0,1 ml/l a malo by byť rovnaké pre všetky pokusné nádrže. Musí byť známe, akým spôsobom prispievajú spoločne s testovanou látkou k celkovému obsahu organicky viazaného uhlíka v testovanej vode. V každom prípade treba urobiť všetko pre to, aby sa tieto látky nemuseli vôbec používať.

1.8.2.8. Kontroly

Okrem pokusných skupín je potrebné mať aj kontrolnú skupinu udržiavanú iba v riediacej vode a v príslušných prípadoch aj kontrolnú skupinu udržiavanú v riediacej vode s prídavkom iba solubilizačného činidla. Podmienkou je, aby solubilizačné činidlo nemalo na ryby žiadny účinok. Ak takýto účinok má, potom je potrebné zaradiť do pokusu obidve kontrolné skupiny.

1.8.3. *Frekvencia merania kvality vody*

Počas testu treba vo všetkých nádržiach sledovať obsah rozpusteného kyslíka, TOC, pH a teplotu. Pri kontrolnej skupine a v jednej nádrži s vyššou (najvyššou) koncentráciou treba merať celkovú tvrdosť, a ak to prichádza do úvahy, aj slanosť vody. Množstvo rozpusteného kyslíka, a ak to prichádza do úvahy, aj slanosť je počas vychytávacej fázy potrebné merať minimálne tri razy, t. j. na jej začiatku, približne v strede a na konci. Počas depuračnej fázy treba tieto hodnoty merať raz týždenne. TOC sa musí merať na začiatku testu (24 a 48 hodín pred začatím vychytávacej fázy) pred pridaním rýb a potom najmenej raz týždenne počas vychytávacej aj depuračnej fázy. Teplotu treba merať denne, pH na začiatku a konci každého obdobia a tvrdosť raz počas každého testu. Aspoň v jednej nádrži by sa malo zabezpečiť kontinuálne meranie teploty.

▼B

1.8.4. *Odber a analyzovanie vzoriek rýb a vody*

1.8.4.1. Harmonogram odoberania vzoriek rýb a vody

Voda na stanovenie koncentrácie testovanej látky sa z testovacích nádrží odoberá pred pridaním rýb a počas vychytávacej i depuračnej fázy. Vzorky vody sa ako minimum odoberajú v rovnakom čase ako ryby a tiež pred kŕmením. Počas vychytávacej fázy sa merajú koncentrácie testovanej látky, aby sa overovalo spĺňanie kritéria platnosti.

Vzorky rýb sa odoberajú najmenej päť ráz počas vychytávacej a najmenej štyri razy počas depuračnej fázy. Dostatočne presné hodnoty BCF sa niekedy pri takomto počte vzoriek vypočítavajú veľmi ťažko, najmä ak sa depurácia zjavne riadi inou ako jednoduchou kinetikou prvého poriadku. V takýchto prípadoch je žiaduce robiť odber počas oboch fáz častejšie (pozri dodatok 4). Navyše odobraté vzorky sa uskladňujú a analyzujú iba vtedy, ak sa výsledky prvého kola analýz ukážu byť pre výpočet BCF s požadovanou presnosťou nedostatočné.

Príklad prijateľného harmonogramu odberu vzoriek je uvedený v dodatku 4. Jednoducho možno vypočítať aj iné harmonogramy, použijúc pri tom iné predpokladané hodnoty P_{ow} potrebné na výpočet dĺžky vystavenia, ktorá je potrebná na dosiahnutie 95 % vychytávania.

Počas vychytávacej fázy pokračujú odbery až po dosiahnutie rovnovážneho stavu alebo počas 28 dní, podľa toho, čo nastane skôr. Ak sa rovnovážny stav do 28 dní nedosiahne, odbery pokračujú až do jeho dosiahnutia alebo počas 60 dní, podľa toho, čo nastane skôr. Pred začatím depuračnej fázy sa ryby premiestnia do čistej nádrže.

1.8.4.2. Odber a príprava vzoriek

Vzorky vody sa na analyzovanie odoberajú napríklad odsávaním pomocou inertnej hadičky zo stredu testovacej nádrže. Oddelenie frakcií testovanej látky dostupných pre biodegradáciu od frakcií pre biodegradáciu nedostupných často nemožno uskutočniť ani filtráciou, ani centrifugáciou (najmä v prípade superlipofilných chemikálií s hodnotou log P_{ow} > 5 (1) (5), takže podrobovať vzorky týmto postupom nemusí byť potrebné.

Namiesto toho treba vykonávať také opatrenia, ktoré zabezpečia čo možno najlepšiu čistotu nádrží, a počas vychytávacej aj depuračnej fázy treba sledovať obsah celkového organicky viazaného uhlíka.

Pri každom odbere vzoriek sa z testovacích nádrží odoberie primeraný počet rýb (zvyčajne minimálne štyri). Odobraté ryby sa rýchle opláchnu, osušia pomocou absorpčného materiálu a pomocou najprimeranejšej a najhumánnejšej metódy ihneď usmrtia a odvážia.

Voda aj ryby by sa mali analyzovať podľa možnosti ihneď po odbere, čím sa predíde degradácii alebo iným stratám. Priebežne počas vykonávania testu treba vypočítavať približné rýchlosti vychytávania a depurácie. Okamžitým vykonávaním analýz predídeme aj oddialeniu identifikácie dosiahnutia rovnovážneho stavu.

▼B

Pri oddialení analýz treba vzorky primeraným spôsobom uskladniť. Pred začatím štúdie sa treba oboznámiť so správnym spôsobom skladovania danej testovanej látky – napríklad zamrazením, skladovaním pri 4 °C, extrahovaním atď.

1.8.4.3. Kvalita analytických metód

Celý postup v zásade závisí od presnosti a citlivosti analytických metód používaných pri testovanej látke. Treba preto experimentálne overiť, či sú presnosť a reprodukovateľnosť chemických analýz, ako aj úroveň opätovného získania testovanej látky z vody aj z rýb pre danú metódu uspokojivé. Treba tiež overiť, či nie je testovaná látka v detegovateľných množstvách prítomná v riediacej vode.

V prípade potreby sa hodnoty C_w a C_f získané z testu upravia podľa úrovne opätovného získania testovanej látky a hodnôt pozadia zistených pri kontrolách. So vzorkami rýb aj vody je potrebné počas celého testovania zaobchádzať tak, aby sa minimalizovala koncentrácia a straty (vznikajúce napríklad v dôsledku absorpcie na odoberacie zariadenie).

1.8.4.4. Analyzovanie rybích vzoriek

V prípade použitia rádioaktívne označeného materiálu možno stanovovať celé množstvo označenej látky (t. j. materskú zlúčeninu aj jej metabolity) alebo možno vzorky prečistiť a stanovovať materskú látku osobitne. V rovnovážnom stave alebo na konci vychytávacej fázy, podľa toho, čo nastane skôr, možno charakterizovať aj hlavné metabolity. V prípadoch, v ktorých je hodnota BCF vyjadreného celkovým množstvom rádioaktívnych zvyškov ≥ 1 000 %, môže byť žiaduce a pre niektoré kategórie chemických látok, ako sú pesticídy, sa to dôrazne odporúča, aby sa identifikovali a kvantifikovali tie degradačné produkty testovanej látky, ktoré v rybích tkanivách predstavujú v rovnovážnom stave ≥ 10 % celkového množstva zvyškov. Po identifikácii a kvantifikácii degradačných produktov, ktoré predstavujú v rybích tkanivách ≥ 10 % celkového množstva rádioaktívnych zvyškov, sa tiež odporúča identifikácia a kvantifikácia takýchto degradačných produktov aj v testovanej vode.

Koncentráciu testovanej látky je zvyčajne potrebné stanoviť v každej jednej odváženej rybe. Ak to nie je možné, potom možno vzorky odobraté pri rovnakom odbere spájať, hoci spájaním sa obmedzujú štatistické metódy, ktoré možno použiť pri spracúvaní výsledkov. Ak má niektorá štatistická metóda a stupeň štatistickej významnosti osobitnú dôležitosť, potom je potrebné použiť v teste taký počet rýb, ktorý umožní uskutočniť požadovaný spôsob spájania vzoriek (6) (7).

BCF je potrebné vyjadriť ako funkciu celkovej vlhkej hmotnosti a v prípade vysoko lipofilných látok aj ako funkciu obsahu tuku. Ak je to možné, obsah tuku treba stanoviť pri každom odbere vzoriek. Obsah tuku treba stanoviť pomocou vhodnej metódy (literárne odkazy 8 a 2 v dodatku 3). Ako štandardnú metódu možno odporúčať extrakciu zmesou chloroformu a metanolu (9). Jednotlivé metódy neposkytujú rovnaké výsledky (10), pri každej z nich je preto dôležité uviesť podrobné údaje. Ak je to možné, obsah tuku treba stanovovať v rovnakom extrakte, ktorý sa pripravil na analyzovanie testovanej látky, pretože tuky býva často potrebné pred chromatografickým krokom zo vzorky odstrániť. Obsah tukov v rybách (ako mg/kg vlhkej hmotnosti) na konci pokusu by sa nemal líšiť od obsahu tukov na jeho začiatku o viac ako ± 25 %. Treba zaznamenať aj percentuálny obsah sušiny v tkanivách, aby bolo možné vyjadriť obsah tuku aj na suchú hmotnosť.

▼B

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Vychytávacia krivka testovanej látky sa získa grafickým vynášaním koncentrácie v/na rybách (alebo určenom tkanive) počas vychytávacej fázy proti času na aritmetických osiach. Ak krivka dosiahne plató, t. j. ak sa stane približne asymptotická k časovej osi, potom možno rovnovážnu hodnotu BCF_{SS} vypočítať zo vzťahu:

$$\frac{C_f \text{ rovnovážne (priemer)}}{C_w \text{ rovnovážne (priemer)}}$$

Ak sa rovnovážny stav nedosiahne, potom sa môže dať BCF_{SS} vypočítať s presnosťou dostatočnou na vyhodnotenie rizika na základe „rovnovážneho stavu“ pri 80 % ($1{,}6/k_2$) alebo 95 % ($3{,}0/k_2$) rovnováhe.

Stanovuje sa aj koncentračný faktor (BCF_K), ktorý je vyjadrený ako pomer dvoch kinetických konštánt prvého poriadku, t. j. k_1/k_2. Rýchlostná konštanta depurácie (k_2) sa zvyčajne stanovuje z depuračnej krivky (t. j. z grafického znázornenia znižovania koncentrácie testovanej látky v rybách v závislosti od času). Z hodnoty k_2 a na základe Cf, ktorá je odvodená z vychytávacej krivky, sa potom vypočíta rýchlostná konštanta vychytávania (k_1) (pozri tiež dodatok 5). Prednostným spôsobom stanovovania BCFK a oboch rýchlostných konštánt k_1 a k_2 sú nelineárne metódy odhadovania parametrov pomocou počítača (11). Na výpočet k_1 a k_2 možno okrem toho použiť grafické metódy. V prípade zjavnej nelineárnosti depuračnej krivky (t. j. ak sa depurácia neriadi kinetikou prvého poriadku) treba použiť komplexnejšie modely (pozri literárne odkazy v dodatku 3) a poradiť sa s bioštatistikom.

2.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

V prípadoch, v ktorých sa koncentrácie testovaných roztokov pohybujú na úrovni blízkej prahu detegovateľnosti analytickej metódy, treba interpretovať výsledky s veľkou opatrnosťou.

Jasne vymedzené krivky vychytávania a odbúravania sú príznakom dobrej kvality údajov o biokoncentrácii. Rozdiely vychytávacích/depuračných konštánt medzi dvoma testovanými koncentráciami musia byť menšie ako 20 %. Významné rozdiely v rýchlosti vychytávania a depurácie medzi dvoma testovacími koncentráciami treba zaznamenať a treba sa pokúsiť sa o ich možné vysvetlenie. Medza spoľahlivosti hodnôt BCF sa pri dobre zostavených štúdiách zvyčajne približuje k hodnote ± 20 %.

3. **PRÍPRAVA TESTOVACEJ SPRÁVY**

Správa z testu musí obsahovať tieto informácie:

3.1. TESTOVANÁ LÁTKA

— fyzikálna povaha a v primeraných prípadoch fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikačné chemické údaje (vrátane obsahu organicky viazaného uhlíka, ak to prichádza do úvahy)

— v prípade rádioaktívneho označenia presná poloha označeného atómu/označených atómov a percento rádioaktivity viazanej na nečistoty/prímesi.

▼B

3.2. TESTOVACÍ BIOLOGICKÝ DRUH

— vedecký názov, kmeň, pôvod, všetky zásahy uskutočnené pred pokusom, aklimatizácia, vek, rozsah hmotností atď.

3.3. TESTOVACIE PODMIENKY

— typ pokusu (napríklad prietočný alebo poloprietočný systém),

— typ a charakteristiky osvetlenia a dĺžka svetlej fázy/svetlých fáz,

— zostava pokusu (napríklad počet a veľkosť testovacích komôr, rýchlosť výmeny celého objemu vody, počet replikátov, počet rýb v replikáte, počet testovaných koncentrácií, dĺžka vychytávacej a depuračnej fázy, frekvencia odoberania vzoriek rýb a vody),

— metóda prípravy zásobného roztoku a frekvencia jeho obnovovania (solubilizačné činidlo, v prípade použitia musí byť uvedená jeho koncentrácia a príspevok k obsahu organicky viazaného uhlíka),

— nominálne testované koncentrácie, priemery hodnôt nameraných v testovacích nádržiach a ich štandardné odchýlky a spôsob, akým sa vypočítali,

— zdroj zrieďovacej vody, opis jej každého ošetrenia pred pokusom, výsledky každého preukazovania, že ryby sú schopné v pokusnej vode žiť, charakteristiky vody: pH, tvrdosť, teplota, koncentrácia rozpusteného kyslíka, zvyškové hladiny chlóru (ak boli merané), celkový organicky viazaný uhlík, rozsuspendované tuhé častice, slanosť testovacieho média (ak prichádza do úvahy) a všetky ďalšie merania,

— kvalita vody v testovacej nádrži, pH, tvrdosť, TOC, teplota a koncentrácia rozpusteného kyslíka,

— podrobné informácie o režime kŕmenia (napríklad typ krmiva, zdroj, zloženie – prinajmenšom obsah tukov a bielkovín, a ak to je možné, aj dávané množstvo a frekvencia kŕmenia),

— informácie o spracúvaní vzoriek rýb a vody vrátane údajov o ich príprave, skladovaní, extrakcii a analytických metódach použitých pri stanovovaní testovanej látky a obsahu tukov (ak sa meral).

3.4. VÝSLEDKY

— výsledky všetkých predbežných štúdií,

— úhyn rýb v kontrolnej skupine a v skupine nachádzajúcej sa v expozičnej komore a všetky pozorované abnormality v správaní,

— obsah tukov v rybách (ak sa pri testovaní stanovoval),

— krivky (vrátane všetkých nameraných údajov) opisujúce vychytávanie a depuráciu testovanej látky v rybách, čas potrebný na dosiahnutie rovnovážneho stavu,

▼B

— Cf a Cw (spolu so štandardnou odchýlkou a rozsahom, ak je to potrebné) v každom čase odberu vzoriek [Cf je vyjadrené v µg/g vlhkej hmotnosti (ppm) celého tela alebo jeho určeného tkaniva, napríklad tuku, a Cw vyjadrené v µg/ml (ppm)]. Hodnoty Cw pre kontrolné skupiny (treba uviesť aj hodnoty pozadia),

— rovnovážny biokoncentračný faktor (BCFSS), resp. kinetický biokoncentračný faktor (BCFk), a ak to prichádza do úvahy, tak aj 95 % medzu spoľahlivosti pre konštanty vychytávania a depurácie (všetky vyjadrené vzhľadom na celé telo zvieraťa alebo jeho určené tkanivo a celkový obsah tukov, ak bol meraný), medzu spoľahlivosti a štandardné odchýlky (ak sú k dispozícii) a metódy výpočtu pre každú použitú koncentráciu testovanej látky,

— v prípade použitia rádioaktívne označených látok, a ak sa to vyžaduje, možno uviesť aj hromadenie všetkých zachytených metabolitov,

— čokoľvek nezvyčajné, čo sa počas testu pozorovalo, všetky odchýlky od týchto postupov a všetky iné významné informácie.

Počas predbežných pokusov a pri vypracúvaní experimentálnej zostavy minimalizujte výskyt výsledkov typu „nezachytené pri danom prahu detegovateľnosti“, pretože takéto výsledky sa nedajú použiť na výpočet konštánt.

4. **ODKAZY**

(1) Connell D. W. (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 102, pp. 117 – 156.

(2) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993). Non-linear dependence of fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. SAR and QSAR in Environmental Research, 1, pp. 29 – 390.

(3) OECD, Paris (1996). Direct phototransformation of chemicals in water. Environmental Health and Safety Guidance Document Series on Testing and Assessment of Chemicals. No 3.

(4) Kristensen P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals. Water Quality Institute, Denmark.

(5) US EPA 822-94-002 (1994). Great Lake Water Quality Initiative Technical Support Document for the Procedure to Determine Bioaccumulation Factors. July 1994.

(6) US FDA (Food and Drug Administration) Revision. Pesticide Analytical Manual, 1, 5600 Fisher's Lane, Rockville, MD 20852, July 1975.

(7) US EPA (1974). Section 5, A(l). Analysis of Human or Animal Adipose Tissue, in Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples, Thompson J. F. (ed.) Research Triangle Park, N. C. 27711.

(8) Compaan H. (1980) in „The determination of the possible effects of chemicals and wastes on the aquatic environment: degradation, toxicity, bioaccumulation“, Ch. 2.3. Part II. Government Publishing Office, the Hague, Netherlands.

▼B

(9) Gardner et al. (1995). Limn. & Oceanogr. 30, pp. 1099 – 1105.

(10) Randall R. C, Lee H., Ozretich R. J., Lake J. L. and Pruell R. J. (1991). Evaluation of selected methods for normalising pollutant bioaccumulation. Envir. Toxicol. Chem. 10, pp, 1431 – 1436.

(11) CEC, Bioconcentration of chemical substances in fish: the flow-through method- Ring Test Programme, 1984 to 1985. Final report March 1987. Authors: P. Kristensen and N. Nyholm.

(12) ASTM E-1022-84 (Reapproved 1988). Standard Practice for Conducting Bioconcentration Tests with Fishes and Saltwater Bivalve Molluscs.

▼B

DODATOK 1

Chemické charakteristiky prijateľnej zrieďovacej vody

	Látka	Hraničná koncentrácia
1	Tuhé častice	5 mg/l
2	Celkový organicky viazaný uhlík	2 mg/l
3	Neionizovaný amoniak	1 µg/l
4	Zvyškový chlór	10 µg/l
5	Celkové pesticídy na báze organofosfátov	50 ng/l
6	Celkové pesticídy na báze organicky viazaného chlóru plus polychlórované bifenyly	50 ng/l
7	Celkový organicky viazaný chlór	25 ng/l
8	Hliník	1 µg/l
9	Arzén	1 µg/l
10	Chróm	1 µg/l
11	Kobalt	1 µg/l
12	Meď	1 µg/l
13	Železo	1 µg/l
14	Olovo	1 µg/l
15	Nikel	1 µg/l
16	Zinok	1 µg/l
17	Kadmium	100 ng/l
18	Ortuť	100 ng/l
19	Striebro	100 ng/l

▼B

DODATOK 2

Druhy rýb odporúčané na testovanie

	Odporúčaný druh	Odporúčaný rozsah testovacích teplôt	Odporúčaná celková dĺžka testovacíchi zvierat (cm)
1	Danio rerio (1) (Teleostei, Cvprinidae) (Hamilton-Buchanan) danio pásikavé	20 – 25	3,0 ± 0,5
2	Pimephales promelas (Teleostei, Cyprinidae) (Rafinesque)	20 – 25	5,0 ± 2,0
3	Cyprinus carpio (Teleostei, Cyprinidae) (Linnaeus) kapor obyčajný	20 – 25	5,0 ± 3,0
4	Oryzias latipes (Teleostei, Poeciliidae) (Temminck a Schlegel) kaprozúbka	20 – 25	4,0 ± 1,0
5	Poccília reticulata (Teleostei, Poecilüdae) (Peters) gupka dúhová	20 – 25	3,0 ± 1,0
6	Lepomis macrochirus (Teleostei, Centrarchidae) (Rafinesque) slnečnica modrohrdlá	20 – 25	5,0 ± 2,0
7	Oncorhynchus mykíss (Teleostei, Salmonidae) (Walbaum) pstruh dúhový	13 – 17	8,0 ± 4,0
S	Gasterosteus aculeatus (Teleostei, Gasterosteidae) (Linneaus) pichľavka siná	18 – 20	3,0 ± 1,0

(1) Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Royal Society of London. Series B.. Vol. 252, p. 231.

V jednotlivých krajinách sa používajú rozličné brakické a morské druhy rýb, napríklad:

	Lelostormus xanthous
kaprozúbka	*Cyprinodon variegntus*
	Menidia bery llina
	Cymatogaster aggregata
	Parophrys vertulus
	Leptocottus armatus
pichľavka siná	*Gasterosteus aculeatus*
pyskatec	*Dicentracus labrax*
belička európska	*Albumus albumus*

Odchyt

Sladkovodné ryby, ktoré sú uvedené v tabuľke, sa jednoducho chovajú, resp. sú dostupné počas celého roka, zatiaľ čo dostupnosť morských a brakických druhov je čiastočne obmedzená na jednotlivé krajiny. V kontrolovaných podmienkach bez výskytu ochorení a parazitov ich možno rozmnožovať a chovať buď na rybích farmách, alebo v laboratóriách, takže pokusné zvieratá sú zdravé a je známy ich pôvod. Tieto ryby sú dostupné v mnohých častiach sveta.

▼B

DODATOK 3

Predpoveď trvania vychytávacej a depuračnej fázy

1. *Predpoveď trvania vychytávacej fázy*

Pred vykonaním testu možno na základe empirického vzťahu medzí k_2 a rozdeľovacím koeficientom pre zmes n-oktanol/voda (P_{ow}) alebo medzi k_2 a rozpu st nosťou vo vode (s) odhadnúť hodnotu konštanty k_2, a tým aj istý zlomok času potrebný na dosiabnutie rovnovážnebo stavu.

Odhad hodnoty k_2 (vyjadrený ako deň$^{-1}$) možno získať napríklad na základe tohto vzťahu (1)]:

$\log_{10} k_2 = - 0{,}414 \log_{10}(P_{ow}) + 1{,}47$ ($r^2 = 0{,}95$) (rovnica 1)

Ďalšie vzťahy sú uvedené v odkaze (2).

Ak hodnota P_{ow} nie je známa, potom sa dá odhad (3) urobiť na základe znalosti rozpustnosti látky (s) pomocou vzťahu:

$\log_{10} (P_{ow}) = 0{,}862 \log_{10}(s) + 0{,}710$ ($r^2 = 0{,}994$) (rovnica 2)

kde

s = rozpustnosť (mol/l): (n = 36).

Tieto vzťahy platia iba pre chemické látky s hodnotou log P_{ow} v rozmedzí 2 a 6,5 (4).

Čas potrebný na dosiahnutie istej časti rov novážn eh o stavu sa dá získať pomocou dosadenia hodnoty k_2 do všeobecnej kinetickej rovnice, ktorá opisuje vychytávanje a depuráciu (kinetika prvého poriadku):

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f$$

alebo ak je C_w konštantné

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w(1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{(rovnica 3)}$$

V oblastiach blízkych rovnovážnemu stavu (t—> ∞) možno rovnicu 3 zjednodušiť (5) (6) na vzťah:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \text{ alebo } C_f / C_w = k_1/k_2 = \text{BCF}$$

Hodnota súčinu $k_1/k_2 \cdot C_w$ sa približuje ku koncentrácii v rybách pri „rovnovážnom stave“ ($C_{f,s}$).

Rovnica 3 sa dá prepisať takto]

$$C_f = C_{f,s}(1 - e^{-k_2 t}) \text{ alebo } \frac{C_f}{C_{fs}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad \text{(rovnica 4)}$$

Po predbežnom odhade hodnoty k_2 na základe rovnice 1 alebo 2 možno pomocou rovnice 4 vypočítať určité percento rovnovážneho stavu.

▼B

Ako orientácia platí, že štatisticky významná dĺžka trvania vy c hytávace j fázy pre získanie statistic ky významných údajov (BCF_K) je čas. za ktorý dosiahne krivka závislosti logaritmu koncentrácie testovanej látky v rybách od lineárneho času svoju polovicu, čiže $1,6/k_2$ alebo 80 % rovnovážneho stavu, avšak nie viac ako $3,0/k_2$ alebo 95 % rovnovážneho stavu (7).

Čas potrebný na dosiahnutie 80 % rovnovážneho stavu je (rovnica 4):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \text{ jeb } t_{80} = \frac{1,6}{k_2} \qquad \text{(rovnica 5)}$$

Podobne pre 95 % rovnovážneho stavu platí:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2} \qquad \text{(rovnica 6)}$$

Napríklad trvanie vychytávacej fázy (zvyšovanie koncentrácie) pre látky s hodnotou log P_{ow} = 4 je (s použitím rovníc 1, 5 a 6):

$\log_{10} k_2 = - 0,414.(4) + 1,47$ $\qquad k_2 = 0,652$ dní$^{-1}$

do (80 %) = 1,6/0,652, t. j. 2,45 dní (59 hodín)

alebo do (95 %) = 3,0/0,652, t. j. 4,60 dní (110 hodín)

Podobne pre testovanú látku s hodnotou s = 10^{-5} mol/l (log(s) = 5,0) je trvanie zvyšovania koncentrácie (rovnice 1, 2, 5 a 6):

$\log_{10} (p_{ow}) = - 0,862 (- 5,0)+ 0,710= 5,02$

$\log_{10} k_2 = - 0,414 (5,02) + 1,47$

$k_2 = 0,246$ dní$^{-1}$

do (80 %) = 1,6/0,246, t. j. 6,5 dní (156 hodín)

alebo do (95 %) = 3,0/0,246, t. j. 12,2 dní (293 hodín)

Alternatívne výraz:

$t_{eq =} 6,54 \times 10^{-3} P_{ow} + 55,31$ (hodiny).

možno použiť na vypočítanie času potrebného na dosiahnutie efektívneho rovnovážneho stavu (4).

2. Predpovedanie trvama depuračnej fázy

Na základe všeobecnej rovnice opisujúcej vychyrávanie a deputáciu (kinetika prvého poriadku) sa dá odhadnúť aj čas, ktorý je potrebný na zníženie telesnej koncentrácie látky na určité percento jej pôvodnej koncentrácie v tele (1) (8).

Predpokladá sa, že hodnota C_w je počas depuračnej fázy nulová. Rovnicu možno preto zjednodušiť na vzťah:

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f \text{ alebo } C_f = C_{f,o} \cdot e^{-k_2 t}$$

▼B

kde $C_{f,\,o}$ je koncentrácia na začiatku depuračnej fázy. 50 % depurácia sa potom dosiahne za čas (t_{50}):

$$\frac{C_f}{C_{f,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \text{ alebo } t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

Podobne sa dá vypočítať, že 95 % depurácia sa dosiahne za:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$

Ak sa v prvom období dosiahne 80 % vychytávania ($1,6/k_2$) a celkové odbúranie počas depuračnej fázy bude 95 % ($3,0/k_2$), potom trvá depuračná fáza približne dva razy tak dlho ako fáza vychytávacia.

Je však potrebné mať na pamäti, že tieto odhady sú založené na predpoklade, že vychytávame aj depurácia sa riadia kinetikou prvého poriadku. Ak pri nich kinetika prvého poriadku zjavne neplatí, potom je potrebné použiť komplexnejšie modely [uvedené napríklad v odkaze (1)].

Odkazy (citované v dodatku 5)

(1) Spacie A. a Hamelink J. L. (1982), Alternative *models for describing the bloconcentration of organics in fish*. Environ, Toxicol, and Chem. 1. pp. 309 – 320.

(2) Kristensen P. (1991). Bioconcentration *in fish: comparison of bioconcentration factors derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate organic matter to the bioavailability of chemicals*. Water Quality Institute, Denmark.

(3) J. Chiou C T, a Schmedding D. W, (1982), *Partitioning of organic Compounds in octanol-water systems*. Environ, Sci. Technol 16 (1), pp, 4 – 10.

(4) Hawker D. W. and Connell D, W, (1988). *influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish*. Wat. Res. 22 (6), pp. 701 – 707.

(5) Branson D. R., Blau G. E,, Alexander H. C and Neely W, B. (1975), *Transactions of the American Fisheries Society*, 104 (4), pp, 785 – 792.

(6) Ernst W. (1985), *Accumulation in Aquatic Organisms. In: Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals*. Ed, By Sheehman P., Korte F., Klein W. and Bourdeau P, H, Part 4,4. pp 24 3-255. SCOPE. 1 98 5. John Wiley and Sons Ltd, N. Y.

(7) Reilly P, M,, Bajramovic R., Blau G, E.., Branson D, R. and Sauerhoff M. W. (1977). *Guidelines for the optimal design of experiments to estimate parameters in first order kinetic models*, Can, J. Chem. Eng. 55, pp, 514 – 622.

(8) Könemann H, and Van Leeuwen K. (1980), *Toxicokinetics in fish: Accumulation and Elimination of Six Chlorobenzenes by Guppies*. Chemosphere, 9, pp. 3 – 19.

▼B

DODATOK 4

Teoretický príklad odberu vzoriek pre stanovovanie biokoncentrácie látok s hodnotou log P_{ow} = 4

Odbery rýb	Harmonogram odberov		Počet vzoriek vody	Počet rýb na vzorku
	Minimálna požadovaná častosť odberov (dni)	Prídavné odbery		
Vychytávacia faza	-1 0		20 (*) 2	Pridať 45 až 30 rýb
Prvý	0,3	0,4	2 (2)	4 (4)
Druhý	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
Tretí	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
Štvrttý	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
Piaty	4,7		2	6
Depuračná fáza				Preniesť ryby do vody bez testovanej látky
Šiesty	5,0	5,3		4 (4)
Siedmy	5,9	7,0		4 (4)
Ôsmv	9,3	11,2		4 (4)
Deviaty	14,0	17,5		6 (4)

(*) Vodu odoberajte až po pridaní najmenej „troch objemov testovacej komory“.

Čísla v zátvorkách udávajú počet vzoriek (vody, rýb), ktoré sa majú odobrať v prípade dodatočného odoberania vzoriek.

Pozn.: Vopred odhadnutá hodnota k_2 pre látky s log P_{ow} = 4 je 0,652 $dňa^{-1}$. Celkové trvanie pokusu je 3 × fázy vychytávania: 3 × 4,6 dňa, t. j. 14 dní. Spôsob odhadu „fázy vychytávania“ je uvedený v dodatku 3.

▼B

DODATOK 5

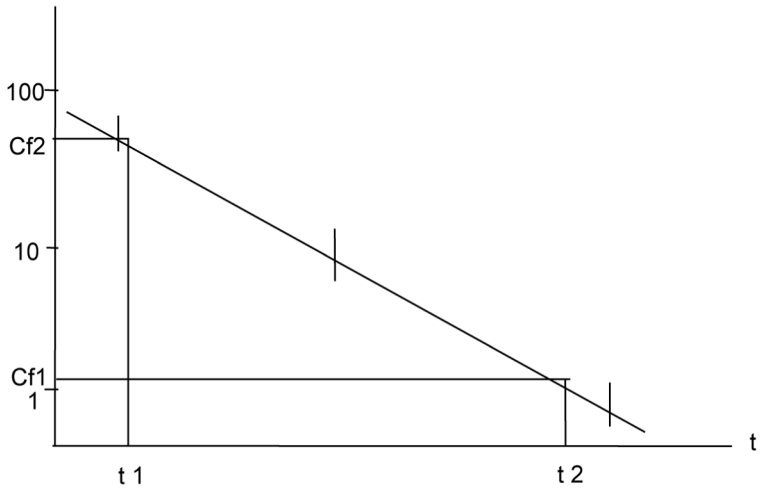
Rozlišovacia schopnosť modelu

Pri väčšine biokoncentračných údajov sa predpokladá, že sú „dostatočne uspokojivo“ opísané pomocou dvojdielneho/dvojparametrového modelu, ktorý vyplýva z priamky udávajúcej koncentrácie testovanej látky v rybách počas depuračnej fázy, keď sa graficky znázornia na semilogaritmickom papieri. (Ak nemožno tieto body opísať priamkou, potom treba použiť komplexnejšie modely; pozri napríklad v Spacie a Hamelink. odkaz 1 v dodatku 3.)

Grafická metóda na stanovenie rýchlostnej konštanty depurácie (eliminácie) k_2

Vyneste koncentráciu testovanej látky zistenú v každej rybej vzorke proti času na semilogaritmickom papieri. Sklon krivky je:

$$k_2 = \frac{\ln (C_{f1}/C_{f2})}{t_2 - t_1}$$



Treba si uvedomiť, že odchýlky od priamkového priebehu môžu poukazovať na komplexnejší priebeh depurácie ako ten, ktorý podlieha kinetike prvého poriadku. Na riešenie priebehu depurácie podliehajúcej kinetike nie prvého poriadku môže byť potrebné použitie grafickej metódy.

Grafická metóda na stanovenie konštanty vychytávania k_1

Hodnota k_1 sa na základe známej hodnoty k_2 vypočíta takto:

$$k_1 = \frac{C_f k_2}{C_w \times (1 - e^{-k_2 t})} \qquad \text{(rovnica 1)}$$

Hod nota C_f sa odčíta v strede hladkej vychytávacej priamky získanej z údajov vynesením dekadického logaritmu koncentrácie proti času (v aritmetickej mierke).

▼B

Počítačová metóda na výpočet rýchlostných konštánt vychytávania a depurácie

Prednostnou metódou na stanovovanie biokoncentračného faktora a oboch rýchlostných konštánt k_1 a k_2 sú nelineárne metódy odhadovania parametrov pomocou počítača. Tieto programy vypočítavajú hodnoty pre k_1 a k_2 na základe známych po sebe idúcich koncentrácií v čase a podľa tohto modelu:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times \left(1 - e^{-k_2 t}\right) \quad 0 < t < t_c \qquad \text{(rovnica 2)}$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times \left(e^{-k_2 (t - t_c)} - e^{-k_2 t}\right) \quad t < t_c \qquad \text{(rovnica 3)}$$

kde t_c = čas na konci vychytávacej fázy.

Takýmto prístupom možno získať odhady štandardných odchýlok k_1 a k_2.

Hodnotu k_2 možno vo väčšine prípadov stanoviť na základe depuračnej krivky s veľkou presnosťou a medzi k_1 a k_2 existuje silná korelácia, ak sa stanovujú súčasne. Odporúčame preto, aby sa najprv vypočítala na základe iba depuračných údajov hodnota k_2 a potom možno pomocou nelineárnej regresnej analýzy vypočítať k_1.

▼B

C.14. RASTOVÝ TEST MLÁĎAT RÝB

1. METÓDA

Táto testovacia metóda vplyvu toxicity na rast rýb je totožná s metódou OECD TG 215 (2000).

1.1. ÚVOD

Tento test je určený na odhadnutie účinkov predĺženého pôsobenia chemických látok na rast mláďat rýb. Vychádza z metódy, ktorá bola vyvinutá a podrobená skupinovým testom (1) (2) v rámci Európskej únie, používa sa na odhadnutie účinkov chemických látok na rast mláďat pstruha dúhového *(Oncorynchus mykiss)* za prietočných podmienok. Môžu sa použiť aj iné dobre zdokumentované druhy. K dispozícii sú napríklad skúsenosti z rastových testov pre zebričky *(Danio rerio)* ([1]) (3), (4) a ryžové rybky ((medaka, *Oryzias latipes)* (6) (7) (8).

Pozri všeobecný úvod časť C.

1.2. DEFINÍCIE

Najnižšia zistená účinná koncentrácia (LOEC): je najnižšia testovaná koncentrácia látky, pri ktorej je pozorované, že má významný účinok ($p < 0,05$) v porovnaní s kontrolou. Všetky skúšobné koncentrácie vyššie ako LOEC musia mať škodlivé účinky rovnaké alebo vyššie než účinky pozorované pri LOEC.

Nezistená účinná koncentrácia (NOEC): je testovaná koncentrácia hneď pod LOEC.

EC_x: v tejto skúšobnej metóde je to koncentrácia testovanej látky, ktorá spôsobila x % zmenu v raste rýb, ak sa porovnajú s kontrolnou skupinou.

Nasadené množstvo: je mokrá hmotnosť rýb na objem vody.

Chovná hustota: je počet rýb na objem vody.

Špecifická rastová miera individuálnej ryby: vyjadruje mieru rastu jedného indivídua, založenú na jeho počiatočnej hmotnosti.

Priemerná špecifická rastová miera v nádrži: vyjadruje význam miery rastu pre populáciu v nádrži pri jednej koncentrácií.

Pseudošpecifická miera rastu: vyjadruje individuálnu mieru rastu porovnaním s počiatočnou hmotnosťou populácie v nádrži.

([1]) Meyer, A., Bierman, C.H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish *(Danio rerio),* a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252. 231 – 236.

▼B

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Mláďatá rýb v exponenciálnej fáze rastu sa po ich zvážení umiestnia do testovacích komôr a sú vystavené účinkom testovanej látky, rozpustenej vo vode v rôznych subletálnych koncentráciách, najlepšie pri prietočných podmienkach, alebo ak to nie je možné, pri vhodných semistatických podmienkach. Doba testu je 28 dní. Ryby sa kŕmia denne. Dávka potravy závisí od počiatočnej hmotnosti ryby a prepočítava sa po 14-tich dňoch. Na konci testu sa ryby odvážia znovu. Vplyvy na mieru rastu sa analyzujú použitím regresného modelu, aby sa odhadla koncentrácia, ktorá môže spôsobiť x-percentnú odchýlku v miere rastu, t. j. EC_x (napr. EC_{10}, EC_{20} alebo EC_{30}). Údaje sa môžu porovnať s kontrolnými hodnotami, a tým sa stanoví najnižšia zistená efektívna koncentrácia (LOEC) a odtiaľ nezistená efektívna (účinná) koncentrácia (NOEC).

1.4. INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LATKE

Výsledky testov akútnej toxicity (pozri testovaciu metódu C.1.) prevedených najlepšie s druhmi vybratými na tento test by mali byť dostupné. Z toho vyplýva, že rozpustnosť vo vode a tlak pár testovanej látky je známy a že je dostupná spoľahlivá analytická metóda na kvantitatívne stanovenie testovanej látky v testovanom roztoku a tiež sa dá stanoviť rozpätie údajov o presnosti.

Užitočné sú informácie ako štruktúrny vzorec, čistota látky, stabilita vo vode a na svetle pK_a (disociačná konštanta), P_{ow} (rozdeľovaci koeficient v systéme oktanol-voda), výsledky z testov biodegradability (pozri testovacia metóda C.4.).

1.5. PLATNOSŤ TESTOVACEJ METÓDY

Pre platnosť testu je potrebné uplatňovať nasledujúce podmienky:

— mortalita v kontrolných skupinách nesmie presiahnuť 10 % na konci testu,

— hmotnosť rýb v kontrolnej skupine musí dostatočne narásť, aby umožnila detekcie minimálnej odchýlky v miere rastu, ktorá je považovaná za významnú. Kruhový test (2) ukázal, že pre dúhového pstruha musí hmotnosť v kontrolnej vzorke vzrásť najmenej o polovicu (t. j. 50 %) z ich počiatočnej hmotnosti za 28 dní napr. počiatočná hmotnosť 1g/ryba (= 100 %), konečná hmotnosť po 28 dňoch: > 1,5 g/ryba (> 150 %),

— koncentrácia rozpusteného kyslíka musí byť najmenej 60 % saturačnej hodnoty vzduchom (ASV) počas testu,

— teplota vody sa môže líšiť nie viac ako ± 1 °C medzi testovacími komorami v danom čase testu a mala by byť udržiavaná v rozsahu 2 °C v teplotných rozsahoch špecifikovaných pre testovaný druh (dodatok 1).

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. **Zariadenie**

Obvyklé laboratórne vybavenie a nasledujúce špeciálne zariadenie:

— zariadenie na meranie kyslíka a pH meter,

▼B

— zariadenie na stanovenie tvrdosti vody a alkality,

— vhodné prístroje na kontrolu teploty a kontinuálne monitorovanie,

— nádrže z chemicky inertných materiálov a vhodnej kapacity v súvislosti na odporučenú násadu a sieťovú hustotu (pozri odsek 1.8.5. a dodatok 1),

— vhodné presné váhy (t. j. presnosť do ± 0,5 %).

1.6.2. **Voda**

Použiteľná voda na test je každá voda, v ktorej testovaný druh vykazuje vhodné dlhotrvajúce prežívanie a rast. Musí mať konštantnú kvalitu počas celého testu. pH vody má byť v rozsahu od 6,5 do 8,5, ale počas daného testu môže byť v rozsahu ± 0,5 pH jednotky. Odporučená tvrdosť vody je 140 mg/l (ako $CaCO_3$). Aby sa zaistilo, že voda používaná ako rozpúšťadlo nebude mať prílišný vplyv na výsledky testu (napr. tvorbu komplexu testovanej látky), vzorky sa odoberajú v intervaloch počas analýzy. Ak je známe, že voda má relatívne konštantnú kvalitu, zistenie ťažkých kovov (napr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd a Ni), hlavných aniónov a katiónov (napr. Ca, Mg, Na, K, Cl a SO_4), pesticídov (napr. celkové organofosforečné a organochlórové pesticídy) celkového organického uhlíka, suspendovaných látok sa vykonáva napr. každé tri mesiace. Ak sa potvrdilo, že kvalita vody je stabilná najmenej počas jedného roka, zistenia sa nemusia vykonávať tak často a intervaly medzi nimi sa môžu predĺžiť (napr. každý šiesty mesiac). Niektoré chemické vlastnosti pre vodu určenú na rozpúšťanie sú v zozname v dodatku 2.

1.6.3. **Testované roztoky**

Testovacie roztoky vybraných koncentrácií sa pripravia riedením zásobného roztoku.

Zásobný roztok má byť pripravený jednoduchým miešaním alebo trepaním testovanej látky v riediacej vode mechanickým prostriedkom (napr. miešaním alebo ultrazvukom). Nasycovanie kolón sa môže využiť na docielenie vhodne koncentrovaných zásobných roztokov.

Použitie rozpúšťadiel alebo látok zlepšujúcich rozpustnosť sa môže vyžadovať v niektorých prípadoch, aby sa zabezpečila príprava vhodne koncentrovaných zásobných roztokov. Vhodnými rozpúšťadlami sú napr. acetón, etanol, metanol, dimetyl sulfoxid, dimetylformamid a trityléngly kol. Príklady vhodných dispergentov sú Cremophor RH 40, Tween 80, Methylcellulose 0,01 % a HCO-40. Ak sa používajú ľahko biodegradovateľné reagenty (napr. acetón) a/alebo vysoko prchavé zlúčeniny, tieto môžu spôsobiť problémy v stavbe baktérií v prietočných testoch. Ak sa použijú látky zvyšujúce rozpustnosť, nesmú mať žiadny signifikantný účinok na rast rýb alebo viditeľné škodlivé účinky na mláďatá, ako by sa preukázali iba pri kontrole rozpúšťadla (napr. meracia pumpa, proporcionálny zmiešavač, saturačný systém).

▼B

Na prietočné testy sa vyžaduje systém, ktorý kontinuálne rozdeľuje zásobný roztok testovanej látky a dodáva ho do testovacích komôr. Prietoky zásobných roztokov a vody na riedenie sa kontrolujú v časových intervaloch, najlepšie denne počas trvania testu a nesmú sa meniť viac ako 10 %. Kruhový test (2) preukázal, že pre pstruha dúhového je postačujúca frekvencia výmeny vody počas testu 6 litrov/g hmotnosti ryby/deň (pozri odsek 1.8.2.2.).

Pre semi-statické testy bude frekvencia výmeny prostredia závisieť od stability testovanej látky, ale odporúča sa denne vymieňať vodu. Ak predbežný test stability preukázal, že koncentrácia testovanej látky nie je stabilná počas periódy obnovy (t. j. je mimo rozsahu 80 – 120 % nominálnej koncentrácie alebo pod 80 % nameranej počiatočnej koncentrácie), je treba vziať do úvahy použitie prietočného testu.

1.6.4. **Výber druhov**

Pstruh dúhový *(Oncorhynchus mykiss)* je odporúčaným druhom na tento test odvtedy, čo sa v skupinových testoch získalo dostatočné množstvo skúseností s týmto druhom (1), (2). Môžu sa však použiť aj iné zdokumentované druhy, ale postupy pri testovaní sa musia prispôsobiť tak, aby sa dosiahli vyhovujúce podmienky testu napr. aj pre zebričku *(Danio rerio)* (3), (4) a ryžovú rybku *(Oryzias latipes)* (5), (6), (7) sú tieto skúsenosti dostatočné. Je potrebné uviesť odôvodnenie na výber druhov rýb a na výber experimentálnej metódy.

1.6.5. **Chov rýb**

Testované ryby sa budú vyberať z populácie jednej zásoby, najlepšie z rovnakého poteru (ikier), ktorý bol držaný najmenej dva týždne pred testom v podobných podmienkach vody a osvetlenia. Musia byť kŕmené dávkou potravy, ktorá sa rovná minimálne 2 % z telesnej hmotnosti ryby na deň a optimálna dávka vo výške 4 % z telesnej hmotnosti ryby na deň v období skladovania a počas testu.

V nasledujúcom 48-hodinovom nastavovacom období je zaznamenávaná mortalita a uplatňujú sa nasledujúce kritériá:

— mortalita vyššia ako 10 % populácie po siedmich dňoch, zamietne sa celá vsádka,

— mortalita medzi 5 % a 10 % z populácie, aklimatizácia ďalších sedem dní, ak je mortalita viac ako 5 % počas druhých siedmich dní, zamietne sa celá vsádka,

— mortalita je menej ako 5 % z populácie po siedmich dňoch, vsádka sa akceptuje.

Ryby nemajú byť vystavené chorobám počas dvoch týždňov predchádzajúcich testu alebo počas testu.

▼B

1.7. KONCEPCIA TESTU

Koncepcia testu sa vzťahuje na výber počtu a odstup testovaných koncentrácií, počet nádrží v každej koncentračnej hladine a počet rýb v každej nádrži. Ideálne je vyberať koncepciu s ohľadom na:

— objekt štúdie,

— metódu štatistickej analýzy, ktorá bude použitá,

— dostupnosť a cenu experimantálnych zdrojov.

Ak je to možné, stav objektu by mal špecifikovať štatistickú váhu, kde daná veľkosť diferencie (napr. miera rastu) a detekcia sa vyžaduje alebo alternatívne sa vyžaduje odhad EC_x (napr. s x = 10, 20 alebo 30, najlepšie na menej ako 10). Bez toho nemôže byť daný nemenný predpis o veľkosti štúdie.

Je dôležité vziať na vedomie, že usporiadanie, ktoré je optimálne (najlepšie využíva prostriedky) pri použití jednej metódy štatistickej analýzy, nie je nutne optimálne pre inú metódu. Doporučené usporiadanie pre odhad LOEC/NOEC teda nebýva rovnaké ako usporiadanie pre analýzu regresií.

V mnohých prípadoch sa regresnej analýze dáva prednosť pred analýzou rozptylu, a to z dôvodov diskutovaných Stephanom a Rogersom (8). Ak sa však nenájde vhodný regresný model (r^2 < 0,9), malo by sa použiť stanovenie NOEC/LOEC.

1.7.1. **Koncepcia regresnej analýzy**

Dôležité predpoklady na koncepciu regresnej analýzy sú:

— Učinná koncentrácia (napr. $EC_{10,\ 20,\ 30}$) a koncentračný rozsah testovanej látky, v ktorom nás zaujímajú jej účinky, a ktoré sa merajú koncentráciami zahrnutými do testu. Ak je efektívna koncentrácia v strede rozsahu testovaných koncentrácií, potom bude presnosť, s ktorou budú vykonané odhady účinných koncentrácií, najvyššia. Pri výbere vhodných testovacích koncentrácií môže byť nápomocný predbežný test na zistenie rozsahu.

— Aby sa umožnilo uspokojivé štatistické vytvorenie modelu, test by mal zahŕňať najmenej jednu kontrolnú nádrž a päť ďalších nádrží pri rôznych koncentráciách. Ak sa použila látka, ktorá zvyšuje rozpustnosť, okrem testovaných sérií je potrebné otestovať jednu kontrolnú nádrž, obsahujúcu látku zvyšujúcu rozpustnosť v najvyššej testovanej koncentrácii, ak je to možné (pozri odsek 1.8.3 a 1.8.4).

— Je potrebné použiť vhodné geometrické alebo logaritmické rady (9) (pozri dodatok 3). Preferuje sa logaritmický odstup medzi testovanými koncentráciami.

▼B

— Ak je k dispozícii viac ako 6 nádrží, každá z nich by mala byť použitá, aby sa získali opakovania alebo distribúcia cez koncentračný rozsah, aby sa umožnilo uzatvorenie hladín. Požaduje sa jedno aj druhé z týchto meraní.

1.7.2. **Koncepcia odhadu NOEC/LOEC za použitia analýzy odchýlok**

Na každú koncentráciu je najvhodnejšie mať niekoľkonásobné nádrže a štatistická analýza sa vykonáva na úrovni nádrže (10). Bez paralelných nádrží nemôže byť uvoľnený žiaden rozptyl na odchýlku medzi nádržami pre jednotlivé ryby. Avšak skúsenosti ukázali (11), že odchýlka medzi nádržami bola veľmi malá v porovnaní s vnútronádržovou (t. j. medzi rybami) v prípade skúšania. Z toho dôvodu je akceptovateľná alternatívna štatistická analýza vykonaná na úrovni jednotlivých rýb.

Obvykle sa používa najmenej päť testovaných koncentrácií v geometrickom rade s faktorom nepresahujúcim hodnotu 3,2.

Vo všeobecnosti, ak sa vykonáva test s niekoľkonásobnými nádržami, počet kontrolných paralelných nádrží a teda aj počet rýb by mal byť dvojnásobok počtu v každej testovanej koncentrácií, ktorý by mal byť rovnaký (12), (13), (14). Na druhej strane, ak sa nepoužili paralelné nádrže, počet rýb v kontrolnej skupine má byť rovnaký ako počet v každej testovanej koncentrácii.

Ak ANOVA vychádza z nádrží uprednostnených pred jednotlivými rybami, [ktoré môžu mať za následok buď individuálnu klasifikáciu, alebo použitie „pseudo“ špecifickej miery rastu (pozri odsek 21.2.)], je potrebné mať dostatočný počet niekoľkonásobných nádrží, aby bolo možné stanoviť štandardnú odchýlku nádrží v rámci koncentrácie. To znamená, že stupne vôle na chyby v analýze odchýlok by mali byť rovné najmenej 5 (10). Ak sú opakované iba kontrolné skupiny, hrozí nebezpečenstvo, že chyba premenlivosti (variability) bude ovplyvnená, pretože sa môže zvýšiť s veľkosťou hodnoty miery rastu. Keďže miera rastu pravdepodobne poklesne so vzrastajúcou koncentráciou, bude to mať za následok tendenciu nadhodnocovať spomínanú variabilitu.

1.8. POSTUP

1.8.1. **Výber a váženie testovaných rýb**

Je dôležité minimalizovať odchýlku v hmotnosti rýb hneď na začiatku testu. Vhodné rozmedzie veľkostí na rôzne odporučené druhy rýb na tento test sú dané v dodatku 1. Pre celú skupinu rýb použitých v teste by sa mal rozsah individuálnych hmotností na začiatku štartu udržiavať v optimálnom stave ± 10 % aritmetického priemeru hmotnosti a v žiadnom prípade nemôže prekročiť 25 %. Odporúča sa odvážiť aj vedľajšiu vzorku rýb pred testom, aby sa mohla odhadnúť priemerná hmotnosť.

▼B

Zásobná populácia nedostane potravu 24 hodín pred začiatkom testu. Ryby sa potom vyberajú náhodne. Po použití obvyklého anestetika [napr. vodný roztok 100 mg/l tricaine metán sulfonátu (MS 222) neutralizovaného pridaním dvoch dielov bikarbonátu sodného na jeden diel MS 222], ryby budú vážené jednotlivo ako mokrá hmotnosť (vytreté do sucha) s presnosťou danou v dodatku 1. Ryby s hmotnosťou v naplánovanom rozsahu sa ponechajú a potom náhodne rozdelia do testovacích nádob. Je potrebné zaznamenať celkovú mokrú hmotnosť rýb v testovacej nádobe. Použité anestetiká, ako aj manipulácia s rybami (vrátane otierania a váženia) môžu spôsobiť stres a poškodenie mláďat rýb, predovšetkým tých druhov, ktoré sú malých rozmerov. Z tohto dôvodu sa musí manipulácia s mláďatami rýb vykonávať s najväčšou možnou opatrnosťou, aby sa neprivodil stres a poškodenie testovaných zvierat.

Ryby sa opätovne odvážia po 28 dňoch testu (pozri odsek 1.8.6). Ak sa však nazdávame, že je potrebné znova vypočítať dávky krmiva, ryby sa odvážia znovu na 14. deň testu (pozri odsek 1.8.2.3). Na stanovenie zmien vo veľkosti rýb sa môže sa použiť aj iná metóda, napríklad fotografická, na základe ktorej sa môže regulovať dávka potravy.

1.8.2. **Podmienky expozície**

1.8.2.1. *Trvanie*

Test trvá ≥ 28 dní.

1.8.2.2. *Nasadené množstvá a chovná hustota*

Je dôležité, aby nasadené množstvo a chovná hustota boli vhodné na použitý testovaný druh (pozri dodatok 1). Ak je chovná hustota príliš vysoká, stres z nahustenia môže privodiť zníženie miery rastu a chorobnosť násady. Ak je príliš nízka, teritoriálne správanie dokáže ovplyvňovať rast. V každom prípade by nasadené množstvo malo byť dostatočne nízke, aby sa dosiahla koncentrácia rozpustného kyslíka najmenej 60 % AS V bez použitia prevzdušňovača. Skupinové testy (2) ukázali, že u pstruha dúhového je prípustné nasadenie množstva 16 pstruhov o hmotnosti 3 – 5 g v objeme 40 l. Odporúčaná frekvencia výmeny vody počas testu je 6 l/g na telesnú hmotnosť ryby/deň.

1.8.2.3. *Kŕmenie*

Ryby sa budú kŕmiť vhodnou potravou (dodatok 1), a to v dostatočnom množstve, aby sa vyvolala akceptovateľná miera rastu. Treba dbať na to, aby sa neprivodil rast mikroorganizmov alebo zákal vody. U pstruha dúhového je množstvo 4 % z ich telesnej hmotnosti na deň vhodná dávka spĺňajúca tieto podmienky (2), (15), (16), (17). Denná dávka môže byť rozdelená do dvoch porcií a dáva sa rybám v dvoch kŕmeniach za deň, oddelene, najmenej po piatich hodinách. Dávka závisí od počiatočnej celkovej hmotnosti rýb v každej testovacej nádobe. Ak sú ryby znovu vážené v 14-ty deň, dávka sa potom prepočíta. 24 hodín pred vážením sa ryby nekŕmia.

▼B

Nezjedená potrava a fekálny materiál sa odstraňujú z testovacích nádob každý deň, dôkladne sa vyčistí dno každej nádoby pomocou odsávania.

1.8.2.4. *Svetlo a teplota*

Fotoperióda a teplota vody by mali byť vhodné pre testovacie druhy (dodatok 1).

1.8.3. **Testované koncentrácie**

Bežne sa vyžaduje 5 rôznych koncentrácií testovanej látky, podľa variácie koncepcie testu (pozri odsek 1.7.2). Prvotné znalosti o toxicite testovanej látky (napr. z testu akútnej toxicity a/alebo zo štúdií ohľadom rozsahu nálezov) môžu napomôcť pri výbere vhodných testovacích koncentrácií. Ak sa použije menej ako päť koncentrácií, je to potrebné odôvodniť. Najvyššia testovaná koncentrácia by nemala presiahnuť hranicu rozpustnosti testovanej látky vo vode.

Ak sa pri príprave zásaditého roztoku použije činidlo zvyšujúce rozpustnosť testovanej látky, jeho konečná koncentrácia nebude vyššia ako 0,1 ml/l a najvhodnejšie je, ak je rovnaká vo všetkých testovacích nádobách (pozri odsek 1.6.3). Je potrebné však urobiť všetko pre to, aby sme sa vyhli použitiu týchto materiálov.

1.8.4. **Kontroly**

Počet kontrol vodných roztokov závisí od koncepcie testu (pozri odsek 1.7. – 1.7.2.). Ak použijeme rozpustnú chemickú látku, potom je potrebné vykonať aj rovnaký počet jej kontrol, tak ako aj počet kontrol vodných roztokov.

1.8.5. **Frekvencia analytických stanovení a meraní**

Koncentrácia testovanej látky sa počas testu stanovuje v pravidelných intervaloch (pozri dole).

V prietočných testoch by sa mali kontrolovať prietoky zrieďovadla a zásadného roztoku toxickej látky v intervaloch, najlepšie denne a nemali by sa počas testu meniť viac ako o 10 %. Kde sú predpokladané koncentrácie testovanej látky v rozsahu do ± 20 % nominálnych hodnôt (t. j. v rozmedzí od 80 – 120 %, pozri odsek 1.6.2 a 1.6.3), odporúča sa minimálne analyzovať najvyššie a najnižšie testované koncentrácie na začiatku testu a potom následne v týždenných intervaloch. Pri teste, kde sa neočakáva, že koncentrácia testovanej látky zostane do ± 20 % nominálu (na základe údajov o stabilite testovanej látky), je potrebné analyzovať všetky testované koncentrácie, ale podľa rovnakého režimu.

V semistatických testoch, kde sa očakáva, že koncentrácia testovanej látky zostane na ± 20 % nominálnej hodnoty, čo je odporučené ako minimálna koncentrácia, najvyššie a najnižšie testované koncentrácie sa analyzujú ak sú čerstvo pripravené a ihneď pred výmenou na začiatku štúdie a potom v týždenných intervaloch. V testoch, kde sa neočakáva, že koncentrácia testovanej látky zostane na ± 20 % nominálnej koncentrácie, všetky testované koncentrácie musia byť analyzované podľa rovnakého režimu ako stabilizujúce látky.

▼B

Odporúča sa, aby výsledky boli založené na meraných koncentráciách. Ak je však z evidencie preukázateľné, že koncentrácia testovanej látky v roztoku bola uspokojivo udržiavaná v ± 20 % nominálu alebo nameranej počiatočnej koncentrácie počas testu, potom môžu výsledky vychádzať z nominálnej koncentrácie alebo nameranej hodnoty.

Vzorky je potrebné filtrovať (napr. použitý filter s veľkosťou pórov 0,45 μm) alebo odstreďovať. Odstreďovanie je odporučený postup. Ak sa však testovaný materiál neabsorbuje na filtri, filtrácia je tiež akceptovateľná.

Vo všetkých testovacích nádobách sa musí počas testu merať rozpustený kyslík, pH a teplota. Celkovú tvrdosť vody, alkalitu a salinitu (ak je podstatná) je potrebné merať v kontrolných nádobách a v jednej nádobe s najvyššou koncentráciou testovanej látky. Minimálne sa však musí merať 3-krát: rozpustný kyslík a solicita (ak je dôležitá), a to na začiatku, v strede a nakonci testu. V semistatických testoch sa odporúča, aby sa rozpustný kyslík meral častejšie, najlepšie pred a po každej výmene vody alebo najmenej raz za týždeň. Hodnota pH sa meria na začiatku a po každej výmene vody v statickom obnovovacom teste, a to týždenne v prietočnom teste. Tvrdosť vody a alkalita sa meria raz počas testu. Teplota sa monitoruje kontinuálne aspoň v jednej testovacej nádobe.

1.8.6. **Pozorovania**

Hmotnosť: na konci testu všetky prežívajúce ryby musia byť odvážené ako mokrá hmotnosť (trené do sucha) jednak v skupinách v testovacej nádobe alebo individuálne. Váženie zvierat v testovacej nádobe sa preferuje pred individuálnym vážením rýb, ktoré si vyžaduje, aby ryby boli jednotlivo označené. V prípade váženia jednotlivcov, stanovenie špecifickej miery rastu pre jednotlivé ryby, vybratá technika označovania, môžu spôsobiť stres zvieraťu (alternatívne označovanie mrazením je vhodné, napr. použitie farebnej jemnej rybárskej linky).

Ryby sa kontrolujú denne počas testovacieho obdobia a všetky vonkajšie abnormality (ako napr. krvácanie, odfarbenie) a abnormálne správanie, sa zaznamenávajú. Každý úhyn musí byť zapísaný a uhynutá ryba musí byť odstránená tak rýchlo, ako je to možné. Mŕtve ryby sa nenahrádzajú, nasadené množstvo (sádka), hustota chovu sú dostatočné, aby spôsobili vplyv na rast cez zmeny v počte rýb na nádrž. Musí sa však upraviť dávka potravy.

2. ÚDAJE A SPRÁVA

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Odporúča sa, aby sa štatistika zahrnula aj do návrhu aj do analýzy testu, keďže táto testovacia metóda pripúšťa opodstatnené variácie v návrhu experimentu (ako napr. v počte testovacích komôr, v počte testovaných koncentrácií, v počte rýb atď.). Z pohľadu možností prípustných v návrhu testu nie je daný presný postup na štatistickú procedúru.

▼B

Miera rastu sa nedá vypočítať pre nádobu, v ktorej úmrtnosť dosiahla 10 %. Mieru úmrtnosti je však možné indikovať na všetky stupne koncentrácie.

Bez ohľadu na to, ktorá metóda na analýzu údajov sa použije, najdôležitejším pojmom je špecifická miera rastu medzi časom t_1 a časom t_2. Môže sa definovať viacerými spôsobmi v závislosti na tom, či venujeme pozornosť jednotlivým rybám alebo nie, alebo či sa požaduje priemer z nádrže.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

kde:

r_1 = individuálna špecifická miera rastu ryby

r_2 = priemerná špecifická miera rastu pre nádrž

r_3 = „pseudo“ špecifická miera rastu

w_1, w_2 = hmotnosti jednej ryby v čase t_1 a t_2, jednotlivo

$\log_e w_1$ = dekadický logaritmus individuálnej hmotnosti ryby na začiatku štúdie

$\log_e W_2$ = dekadický logaritmus individuálnej hmotnosti ryby na konci štúdie

$\log_e W_1$ = priemerná hodnota dekadického logaritmu z hodnoty w_1 pre rybu v nádrži na začiatku štúdie

$\log_e W_2$ = priemerná hodnota dekadického logaritmu z hodnoty w_2 pre rybu v nádrži na konci štúdie

t_1, t_2 = čas (dni) štart a koniec štúdie

r_1 r_2 r_3 môžu byť vypočítané pre 0 – 28-dňové obdobie a kde je to vhodné (t. j. ak bolo meranie vykonané v 14. dni) na 0 – 14 a 14 – 28 dní periód.

2.1.1. **Regresná analýza výsledkov (modelovanie závislosti koncentrácie)**

Táto analytická metóda zavádza vhodné matematické vzťahy medzi špecifickou mierou rastu a koncentráciou, a teda umožňuje odhad „EC_x“ t. j. akejkoľvek požadovanej EC hodnoty. Použitie tejto metódy na výpočet r pre jednotlivú rybu (r_1) nie je potrebné a namiesto toho analýza môže vychádzať z priemernej hodnoty pre nádrž r (r_2). Uprednostňuje sa použitie poslednej metódy. Je taktiež vhodnejšia v prípade menších druhov rýb.

Špecifická priemerná miera rastu pre nádrž (r_2) môže byť graficky znázornená oproti koncentrácií, aby sa zistil vzťah koncentračnej odozvy.

▼B

Pre vyjadrenie vzťahu medzi r_2 a koncentráciou je potrebné vybrať model a výber musí byť podložený patričným zdôvodnením.

Ak počet rýb, ktoré prežili do konca testu, nie je rovnaký v každej nádrži, potom proces zavádzania modelu, či jednoduchého alebo nelineárneho, musí byť vážený, aby pripúšťal nerovnakú veľkosť skupín.

Metóda zavádzania modelu musí umožňovať odhad, napríklad EC_{20} alebo jej rozptyl/štandardná odchýlka alebo interval spoľahlivosti/, aby sa dali tieto odvodiť. Graf vybratého modelu by mal ukazovať, či je model primeraný (8), (18), (19), (20).

2.1.2. **Analýza výsledkov pre odhad LOEC**

Ak test zahŕňa kópie/repliky/nádrže, odhad LOEC môže vychádzať z analýzy odchýlok (ANOVA) špecifickej miery rastu pre nádrž (pozri odsek 2.1), podľa vhodnej metódy [napr. Dunnettov alebo Williamsov test (12), (13), (14), (21)] porovnávajúci priemernú hodnotu na každú koncentráciu s priemernou hodnotou na kontrolu nádrže, aby sa zistila najnižšia koncentrácia, pre ktorú je odchýlka významná pri hodnote 0,05 stupňa pravdepodobnosti. Ak sa požadované predpoklady parametrických metód nezhodujú, použije sa netypická distribúcia (napr. Shapiro-Wilkov test) alebo heterogénna odchýlka (Barlettov test) na transformovanie údajov na homogénnu odchýlku, a to prednostne pred vykonaním ANOVA alebo váženým ANOVA testom.

Ak test neobsahuje paralelné nádrže pre každú koncentráciu, ANOVA vychádzajúca z nádrží bude necitlivá alebo nemožná. V tejto situácii je akceptovateľným kompromisom ANOVA, vychádzajúca z „pseudo“ špecifickej miery rastu r_3 pre jednotlivé ryby.

Priemerná hodnota r_3 na každú testovanú koncentráciu sa môže potom porovnávať s priemernou hodnotou r_3 na kontrolné nádrže a LOEC sa môže identifikovať rovnako ako v predchádzajúcom prípade. Musí byť jasné, že táto metóda neposkytuje žiadnu dovolenú odchýlku alebo ochranu voči premenlivosti medzi nádržami, okrem tej, ktorá bola vypočítaná na premenlivosť medzi jednotlivými rybami. Skúsenosti (8) však ukázali, že premenlivosť medzi nádržami je veľmi malá v porovnaní s variabilitou v rámci nádrže (t. j. medzi jednotlivými rybami). Ak nie sú do analýzy zahrnuté jednotlivé ryby, je potrebné zdôvodniť použitie metódy vonkaj šej identifikácie.

2.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Výsledky sa musia interpretovať opatrne, ak namerané koncentrácie jedovatých látok v testovaných rozsahoch dosahujú úrovne blízke detekčným limitom analytickej metódy alebo v semistatických testoch, kde koncentrácia testovanej látky klesá medzi koncentráciu v čerstvo pripravenom roztoku a koncentráciou pred výmenou roztoku.

2.3. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí obsahovať nasledujúce informácie:

▼B

2.3.1. **Testovaná látka**

— fyzikálne vlastnosti a závažné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikačné údaje chemickej látky zahrňujúce čistotu a analytickú metódu na kvantitatívne stanovenie testovanej látky, ak je to vhodné.

2.3.2. **Testované druhy**

— podľa možnosti vedecký názov,

— rod, veľkosť, dodávateľ, možná predpríprava atď.,

2.3.3. **Podmienky testu**

— používaná testovacia metóda (napr. semistatická/obnovovacia, prietočná, nakladanie, chovná hustota atď.),

— koncepcia testu (napr. počet testovacích nádob, testované koncentrácie a paralelné stanovenie, počet rýb v nádrži),

— metóda prípravy zásobného roztoku a frekvencia obnovy (ak bolo použité činidlo rozpustnosti, jeho koncentrácia musí byť daná),

— nominálna testovaná koncentrácia, priemery nameraných hodnôt a ich štandardné odchýlky v testovacích nádobách a metóda, ktorou boli tieto hodnoty získané a dôkaz o tom, že merania zodpovedajú koncentráciám testovanej látky v skutočnom roztoku,

— charakteristiky vody použitej na riedenie: pH, tvrdosť, alkalita, teplota, rozpustný kyslík, reziduálny chlór, ak bol stanovený celkový organicky viazaný uhlík, suspendované látky, salinita (obsah solí) z testu prostredia (ak bola stanovená) a iné vykonané merania,

— kvalita vody v testovacích nádržiach: pH, tvrdosť, teplota a koncentrácia rozpustného kyslíka,

— podrobné informácie o kŕmení (napr. druh potravy/zdroj, dávkované množstvo a frekvencia)

2.3.4. **Výsledky**

— dôkaz, že kontrolné nádrže splnili kritériá validity prežívania a údaje o úmrtnosti vyskytujúcej sa pri niektorej z testovaných koncentrácií;

— používané štatistické analytické techniky, štatistiky vychádzajúce z počtu paralelných stanovení alebo na jednotlivých rybách, spracovanie dát a odôvodnenie použitia danej techniky;

— údaje v tabuľkovej forme na jednotlivú a priemernú hmotnosť rýb v dňoch 0, 14 (ak merané) a 28 hodnôt v priemere na nádrž alebo hodnoty „pseudo“ špecifickej miery rastu (ak je to vhodné) počas obdobia 0. – 28. dňa alebo ak je to možné na 0. – 14. a 14.– 28. deň;

— výsledky štatistickej analýzy (t. j. regresnej analýzy alebo ANOVA), najlepšie v tabuľkovej alebo grafickej forme a LOEC ($p = 0,05$) a NOEC alebo ECx so štandardnými chybami;

▼B

— rozsah neobvyklých reakcií rýb a akékoľvek viditeľné účinky vyvolané testovanou látkou.

3. POUŽITÁ LITERATÚRA

(1) Solbe J. F. de LG (1987). Environmental Effects of Chemicals (CFM 9350 SLD). Report on a UK Ring Test of a Method for Studying the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. WRc Report No PRD 1388-M/2.

[Meyer, A., Bierman, C. H. and Orti, G. (1993). The phylogenetic position of the zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology: an invitation to the comparative method. Proc. R. Soc. Lond. B. 252, s. 231 – 236.]

(2) Ashley S., Mallett M. J. and Grandy N. J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.

(3) Crossland N. O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. Chemosphere, 14, s. 1855 – 1870.

(4) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P. D., Market M., Munk R., Scholz N. and Hôfte B. B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. Ecotox. Environ. Safety, 21, s. 157 – 164.

(5) Yamamoto, Tokio. (1975). Series of stock cultures in biological field. Medaka (killifish) biology and strains. Keigaku Publish. Tokio, Japan.

(6) Holcombe, G. W., Benoit D. A., Hammermeister, D. E., Leonard, E. N. and Johnson, R. D. (1995). Acute and long-term effects of nine chemicals on the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Arch. Environ. Conta. Toxicol. 28, s. 287 – 297.

(7) Benoit, D. A., Holcombe, G. W. and Spehar, R. L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. US Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.

(8) Stephan C. E. and Rogers J. W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium, ASTM STP 891, R. C. Bahner and D. J. Hansen, eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, s. 328 – 338.

(9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 1/RM/28, 81 pp.

(10) Cox D. R. (1958). Planning of experiments. Wiley Edt.

(11) Pack S. (1991). Statistical issues concerning the design of tests for determining the effects of chemicals on the growth rate of fish. Room Document 4, OECD Ad Hoc Meeting of Experts on Aquatic Toxicology, WRc Medmenham, UK, 10-12. December 1991.

(12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control, J. Amer. Statist. Assoc, 50, s. 1096 – 1121.

(13) Dunnett C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, s. 482 – 491.

▼B

(14) Williams D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, s. 103 – 117.

(15) Johnston, W. L., Atkinson, J. L., Glanville N. T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level. Aquaculture 120, s. 123 – 133.

(16) Quinton, J. C. and Blake, R. W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Fish Biology, 37, pp. 33 – 41.

(17) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in Testbook of Fish Health. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 pp.

(18) Bruce, R. D. and Versteeg D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data Environ. Toxicol. Chem. 11, s. 1485 – 1494.

(19) DeGraeve, G. M., Cooney, J. M., Pollock, T. L., Reichenbach, J. H., Dean, Marcus, M. D. and Mclntyre, D. O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. Report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, No 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.

(20) Norbert-King T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the ICp approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minnesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assesment Center. Sept. 1988. 12 s.

(21) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28, s. 510 – 531.

▼B

DODATOK 1

DRUHY RÝB ODPORUČENÝCH NA TESTOVANIE A VHODNÉ PODMIENKY NA VYKONANIE TESTOV

Druh	Odporučený rozsah teplôt pri testoch (°C)	Fotoperióda (hod.)	Odporúčany rozsah pre počiatočnú hmotnosť (g)	Požadovaná presnosť merania	Nasadené množstvo (g/l)	Chovná hustota (l)	Potrava	Trvanie testu (dni)
Odporučené druhy:								
Oncorhynchu s mykiss Pstruh dúhový	12,5 – 16,0	12 – 16	1 – 5	na 100 mg	1,2 – 2,0	4	sušená lososovitá potrava	≥ 28
Ostatné dobre zdokumentov ané druhy:								
Danio rerio Zebrička	21 – 25	12 – 16	0,050 – 0,100	na 1 mg	0,2 – 1,0	5 – 10	živá potrava (*Brachionus Artemia*)	≥ 28
Oryzias latipes Ryžová rybka (Medaka)	21 – 25	12 – 16	0,050 – 0,100	na 1 mg	0,2 – 1,0	5 – 20	živá potrava *(Brachionus Artemia)*	≥ 28

▼B

DODATOK 2

NIEKTORÉ CHARAKTERISTIKY VHODNEJ VODY NA RIEDENIE

Látka	Koncentrácie
Látka v časticiach	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Zlúčený uhlík	< 1 µg/l
Zostatkový chlór	< 10 µg/l
Celkové organofosfátové pesticídy	< 50 ng/l
Celkové organochlórované pesticídy plus polychlórované bifenyly	< 50 ng/1
Celkový organický chlór	< 25 ng/1

▼B

DODATOK 3

Logaritmické série koncentrácií vhodných na test na toxicitu (9)

Stĺpec (čislo koncentrácie medzi 100 a 10 alebo medzi 10 a 1) (*)						
1	2	3	4	5	6	7
100	100	100	100	100	100	100
32	46	56	63	68	72	75
10	22	32	40	46	52	56
3,2	10	18	25	32	37	42
1,0	4,6	10	16	22	27	32
	2,2	5,6	10	15	19	24
	1,0	3,2	6,3	10	14	18
		1,8	4,0	6,8	10	13
		1,0	2,5	4,6	7,2	10
			1,6	3,2	5,2	7,5
			1,0	2,2	3,7	5,6
				1,5	2,7	4,2
				1,0	1,9	3,2
					1,4	2,4
					1,0	1,8
						1,3
						1,0

(*) Zo stĺpcov sa dá vybrať päť alebo viac sérií za sebou idúcich koncentrácií. Stredné body medzi koncentráciami v stĺpci x) sa nachádzajú v stĺpci (2x + 1). Uvedené hodnoty predstavujú koncentrácie vyjadrené ako percento na objem alebo hmotnosť (mg/l alebo µg/l). Hodnoty je možné násobiť alebo deliť akoukoľvek mocninou 10 podľa potreby. Hodnoty v stĺpci 1 sa môžu použiť, ak nastala značná neistota ohľadom úrovne toxicity.

▼B

C.15. RYBY, KRÁTKODOBÝ TEST TOXICITY NA EMBRYÁCH A VÝVOJOVOM ŠTÁDIU PLODOVÉHO VAKU

1. METÓDA

Táto testovacia metóda krátkodobého testu toxicity je totožná s metódou OECD TG 212 (1998).

1.1. ÚVOD

Tento test toxicity na rybích embryách a rybách vo vývojovom štádiu plodového vačku – poteru je krátkodobým testom, v ktorom sú vývojové štádiá od čerstvo oplodnených vajíčok po koniec štádia plodového vaku – poteru vystavené účinkom testovanej látky. Rybie embryá a štádiá plodového vaku – poteru sa nekŕmia a test má byť ukončený dovtedy, kým sú rybám v štádiu plodového váčku dodávané živiny zo žĺtkového vaku.

Test je určený na definovanie letálnych účinkov a hraníc subletálnych účinkov chemikálií na vybraté testované vývojové štádiá a druhy rýb. Mal by preto poskytnúť užitočné informácie o tom, či je možné a) nájsť spojitosť medzi letálnymi a subletálnymi testami, b) použiť ho ako screeningový test jednak ako test pre najrannejšie vývojové štádiá alebo ako test chronickej toxicity a c) či je použiteľný pri testovaní druhov tam, kde techniky chovu hospodárenia nie sú dostatočne vyspelé, aby pokryli obdobie zmien od endogénneho k exogénnemu kŕmeniu.

Je potrebné uvedomiť si, že iba testy spájajúce všetky štádiá životného cyklu rýb sú vo všeobecnosti schopné podať presný odhad chronickej toxicity chemikálií u rýb a že pôsobenie obmedzené akýmkoľvek spôsobom s ohľadom na štádium života môže znižovať citlivosť a zároveň podhodnotiť chronickú toxicitu. Preto možno očakávať, že embryonálny test a test v štádiu plodového vaku – poteru môže byť menej citlivý ako najrannejší test úplne vývojového štádia, predovšetkým s ohľadom na vysoko lipofilné chemikálie (log $P_{ow} > 4$) a chemikálie so špeciálnymi spôsobmi toxickej aktivity. Pri chemikáliách s nešpecifickými, narkotickými účinkami sa však môžu očakávané menšie rozdiely v senzitivite medzi dvoma testami (1).

Pred uverejnením testu sa najviac skúseností získalo v testoch na embryonálne štúdium a na štádium plodového vaku – poteru u sladkovodných rýb *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae – bežný názov zebrafish). Podrobnejší návod na vykonanie testu pre tento druh je uvedený v dodatku 1. Toto však nevylučuje použitie iných druhov rýb, s ktorými sú tiež skúsenosti (tabuľka 1).

1.2. DEFINÍCIE

Najnižšia zistená účinná koncentrácia (LOEC): je najnižšia skúmaná koncentrácia testovanej látky, pri ktorej sa pozoruje signifikantný účinok ($p < 0,05$) pri porovnaní s kontrolnou vzorkou. Všetky testované koncentrácie nad LOEC musia mať však škodlivý vplyv rovnajúci sa alebo väčší ako ten, ktorý bol zistený pri LOEC.

Nezistená účinná koncentrácia (NOEC): je testovaná koncentrácia hneď pod LOEC.

▼B

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Embryá a vývojové štádium plodového vaku – poteru rýb sú vystavené účinkom rôznych koncentrácií testovanej látky rozpustenej vo vode. V protokole o teste je možný výber medzi semistatickým a prietočným typom postupu. Výber závisí od charakteru testovanej látky. Test začína umiestnením oplodnených vajíčok do testovacej komory a končí práve predtým, ako ktorákoľvek z lariev v ktorejkoľvek testovanej komore komplexne absorbuje žĺtkový vak alebo pred uhynutím v dôsledku začínajúceho hladovania v kontrolnej komore. Letálne a subletálne účinky sa vyhodnotia a porovnávajú s kontrolnými hodnotami, ak bola stanovená najnižšia zistená účinná koncentrácia alebo sa podrobia analýze použitím regresného modelu, aby sa odhadla koncentrácia, ktorá môže zapríčiniť daný percentuálny účinok (t. j. LC/ECx, kde x je definované ako % účinnosti).

1.4. INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

Výsledky aktuálneho testu toxicity, (pozri metóda C.1) najlepšie toho, ktorý bol vykonaný na druhu ryb vybratom na tento test, musia byť k dispozícii. Môžu byť užitočné pri výbere vhodného rozsahu testovaných koncentrácií na test v ranných vývojových štádiách života ryb. Rozpustnosť vo vode (vrátane rozpustnosti v testovanej vode) a tlak pár testovanej látky musia byť známe. Je potrebné mať spoľahlivú analytickú metódu na kvantitatívne stanovenie látky v testovaných roztokoch so známou a uvedenou presnosťou a detekčným limitom.

Informácie o testovanej látke, ktoré sú použité pri stanovení podmienok testu, zahŕňajú štruktúrny vzorec, čistotu látky, svetelnú stabilitu, stabilitu za podmienok testu, pK_a, P_{ow} a výsledky testov na stupeň biodegradability stupeň biologickej odbúrateľnosti (pozri metóda C.4).

1.5. PLATNOSŤ TESTU

Na platnosť testu je potrebné uplatňovať nasledujúce podmienky:

— počet všetkých oplodnených vajíčok, ktoré prežili v kontrolnej nádrži a ak je to dôležité, iba v nádobách s rozpúšťadlom, musí byť väčší alebo rovný limitom definovaným v doplnkoch (2) a (3),

— koncentrácia rozpusteného kyslíka musí byť počas testu v rozmedzí 60 až 100 % z hodnoty saturácie vzduchu (ASV),

— teplota vody sa nesmie meniť viac ako ± 1,5 °C medzi testovanými komorami alebo medzi nasledujúcimi dňami v určitom časovom intervale testu a bude v rozsahu teplôt určených na testované druhy (dodatky 2 a 3).

▼B

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. **Testovacie komory**

Môžu sa používať nádoby sklenené alebo z iných chemicky inertných látok. Rozmery nádob musia byť dostatočne veľké, aby boli v súlade s nasadeným množstvom rýb (pozri odsek 1.7.1.2). Odporúča sa umiestniť testovacie nádoby náhodne na testovacej ploche. Náhodný blokový dizajn, v ktorom je každý postup prítomný v každom bloku, je najlepší, aby sa zabezpečil úplne náhodný dizajn, v ktorom sú zahrnuté vplyvy laboratória, takže na kontrole sa môže využiť testovanie po blokoch. Ak použijeme testovanie po blokoch, budú sa brať do úvahy aj následné údaje analýzy. Testované komory sa takto ochránia pred nechcenými vplyvmi.

1.6.2. **Výber druhov rýb**

Odporúčané druhy rýb sú dané v tabuľke 1A. To ale neobmedzuje použitie aj iných druhov (príklady uvedené v tabuľke 1B), ale testovací postup musí byť prispôsobovaný tak, aby poskytoval uspokojivé podmienky testu. V tomto prípade je potrebné zaznamenať dôvody, ktoré viedli k výberu iných druhov a experimentálnych metód.

1.6.3. **Chov húfu rýb**

Podrobnosti o chovaní rýb počas množenia za vhodných podmienok nájdete v OECD TG 210 ([1]) metóde a v použitej literatúre (2), (3), (4), (5), (6).

1.6.4. **Manipulácia s embryami a larvami**

Embryá a larvy môžu byť vystavené expozícii v malých vyhovujúcich nádobách so sieťovanými stenami, aby sa umožnilo pretekanie testovaného roztoku cez nádobu. Neturbulentný tok cez tieto malé nádoby je zabezpečený ich zavesením na ramene usporiadanom na pohyb nadol a nahor, ktoré však udržuje organizmy ponorené. Je možné použiť systém prietočný – sifónový. Oplodnené vajíčka lososovitých rýb môžu byť udržované na krmidlách alebo na sieťovine s dostatočne veľkými okami, aby mohli cez ne po vyliahnutí prepadnúť. Na premiestňovanie embryí a lariev pri semistatických testoch s kompletnou dennou výmenou (pozri odsek 1.6.6.) vody je vhodné použiť pasteurove pipety.

Ak sa v hlavnej testovacej nádobe na zadržiavanie vajíčok použili kontajnery, mriežky alebo sieťky, potom po vyliahnutí lariev môžu byť tieto zábrany odstránené [2] s výnimkou, ak mriežky preventívne zabraňujú úniku rýb. Ak je potrebné premiestniť larvy, tieto by nemali byť vystavené vzduchu a nemali by sa používať sieťky na vylovenie rýb z kontajnerov na vajíčka (upozornenie sa netýka menej krehkých druhov rýb, napr. kapra). Načasovanie takéhoto prenosu sa mení v závislosti od druhu rýb a prenos nie je vždy potrebný. Pri semistatickej technike môžeme používať hadičky alebo plytké zásobníky a ak je to nutné, môžu byť vybavené prepážkou zo sieťoviny, nepatrne naddvihnutou nad dnom hadičky. Ak je objem týchto kontajnerov dostatočný, aby vyhovoval požiadavkám pre nasadené množstvo vsádky (poyri 1.7.1.2), žiaden prenos embryí alebo lariev nebude nutný.

([1]) OECD, Paris, 1992, Test Guideline 210, „Fish, Early-life Stage Toxicity Test“.

▼B

1.6.5. **Voda**

Každá voda, spĺňajúca chemické charakteristiky na vodu na riedenie tak, ako sú uvedené v zozname v dodatku 4 a v ktorej testované druhy vykazujú kontrolu prežívania najmenej takú dobrú, ako bolo popísané v dodatkoch 2 a 3, je vhodná ako testovacia voda. Voda má mať konštantnú kvalitu počas celého trvania testu. Jej pH hodnota by sa mala pohybovať v rozmedzí ± 0,5 jednotiek pH, aby sa zabezpečilo, že riedenie nebude mať neželaný vplyv na výsledky testu/napr. vytváranie komplexov s testovanou látkou/alebo nepriaznivý účinok na vyliahnuté zásobné ryby. Vzorky vody na analýzu je potrebné odoberať v určitých intervaloch. Meranie hodnôt ťažkých kovov (napr. Cu, Pb, Zn, Hg, Cd a Ni), hlavných aniónov a katiónov (napr. Ca, Mg, Na, K, Cl a SO_4, pesticídov (napr. celkový obsah organofosforečňanových alebo celkový obsah organochlórovaných pesticídov), celkového organicky viazaného uhlíka v suspendovaných látkach by sa malo vykonávať napr. každé tri mesiace, ak je známe, že zrieďovacia voda má relatívne konštantnú kvalitu. Ak sa preukázalo, že kvalita vody sa upravila najmenej počas jedného roka, merania sa môžu vykonávať menej často a časové intervaly medzi nimi sa môžu predĺžiť (napr. každých šesť mesiacov).

1.6.6. **Testovacie roztoky**

Testovacie roztoky vybratých koncentrácií sa pripravujú riedením zásobných roztokov.

Zásobný roztok môže byť pripravený najčastejšie jednoduchým zmiešaním alebo pretrepávaním testovanej látky v zrieďovacej vode mechanickým spôsobom (napr. trepaním alebo ultrazvukom). Saturácia kolón môže byť využitá na dosiahnutie vhodne koncentrovaných zásobných roztokov. Pokiaľ je to možné, vyhneme sa používaniu rozpúšťadiel a dispergentov (činidlá zvyšujúce rozpustnosť látok), hoci u niektorých zlúčenín v určitých prípadoch sa to vyžaduje, aby sa pripravil vhodne koncentrovaný zásobný roztok. Príklady vhodných rozpúšťadiel sú acetón, metanol, etanol, dimetylformamid a trichylénglykol. Príkladmi používaných dispergentov sú Cremophor RH40, Tween 80, meťnylcellulose 0,01 % a HCO-40. Treba dbať na to, ak sa používajú ľahké činidlá (napr. acetón) a/alebo veľmi prchavé biologicky odbúrateľné látky, môžu tieto spôsobiť problémy s množením baktérií v prietočných testoch. Ak používané činidlo zvyšuje rozpustnosť, nesmie mať žiaden signifikantný účinok na prežívanie alebo žiaden viditeľný nepriaznivý účinok na ranné vývojové štádiá, ako sa to prejavilo v kontrolných nádržiach s rozpúšťadlom. Je však potrebné vynaložiť maximálne úsilie, aby sme sa vyhli použitiu týchto látok.

Pri semistatických technikách môžu nasledovať dva rôzne postupy obnovy: i) do čistých nádob sa pripravia nové testovacie roztoky a prežívajúce vajíčka a larvy sa do nich opatrne prenesú v malých objemoch starého roztoku tak, aby sme sa vyhli ich vystaveniu na vzduchu alebo ii) testované organizmy zostanú umiestnené v nádobách, pokiaľ sa časť (najmenej tri štvrtiny) testovanej vody vymení. Frekvencia obnovy prostredia bude závisieť na stabilite testovanej látky, ale odporúča sa denná výmena. Ak z predbežných testov stability (pozri odsek 14) testovanej látky vyplýva, že koncentrácia testovanej látky nie je stála (t. j. mimo rozsahu 80 – 120 % nominálnej koncentrácie alebo poklesne pod 80 % nameranej počiatočnej koncentrácie) počas obnovovacej periódy, je dôležité použiť prietočný test. V tomto prípade je treba dbať na to, aby sme sa vyhli stresovaniu lariev počas výmeny vody.

▼B

Pri prietočných testoch, v ktorých je systém kontinuálne vypúšťaný a riedený (napr. dávkovacie meracie pumpy, proporcionálny zrieďovač, saturačný systém), zásobný roztok testovanej látky sa vyžaduje dodávať do testovacích nádrží v sériách koncentrácií. Prietoky zásobných roztokov a zrieďovacej vody treba kontrolovať v určitých časových intervaloch, najlepšie denne a nemal by sa meniť viac ako o 10 % počas testu. Prekročené množstvo ekvivalentné objemu najmenej piatich testovacích komôr za 24 hodín sa pokladá za vyhovujúce (2).

1.7. POSTUP

Užitočné informácie o vykonaní testov toxicity na rybích embryách a v štádiu plodového vaku – poteru sú dostupné v literatúre, niektoré príklady sú zahrnuté do zoznamu použitej literatúry v texte (7), (8), (9).

1.7.1. **Podmienky expozície**

1.7.1.1. *Dĺžka testu*

Test je najlepšie začať 30 minút po oplodnení vajíčok. Embryá sa ponoria do testovaného roztoku pred alebo čo najskôr po začatí štádia štiepenia blastodiskov a v žiadnom prípade nie pred započatím štádia gastrulí. Pri vajíčkach od komerčných dodávateľov nie je vhodné začať test ihneď po oplodnení. Ak pozdržanie začiatku testu závažne ovplyvňuje senzibilitu testu, je ho potrebné začať do ôsmich hodín po oplodnení. Ak nie sú larvy kŕmené počas expozičnej periódy, test treba ukončiť práve predtým, ako žĺtkové vačky lariev v testovaných komorách boli kompletne absorbované alebo predtým ako začnú hynúť od hladu v kontrolných komorách. Dĺžka testu bude závisieť od použitých druhov. Niektoré odporúčané dĺžky trvania testov sú uvedené v dodatkoch 2 a 3.

1.7.1.2. *Nasádzanie*

Počet oplodnených vajíčok na začiatku testu musí byť dostatočný na to, aby sa splnili štatistické požiadavky. Rozdelia sa náhodne, najmenej však po 30 oplodnených vajíčok, rozdelených rovnako, alebo tak rovnako ako je to možné. Môže byť dosť zložité získať rovnaké vsádky, ak použijeme niektoré druhy medzi najmenej tri paralelné testovacie komory na jednu koncentráciu. Nasadené množstvo (biomasa) na objem testovaného roztoku má byť dostatočne nízke, aby sa koncentrácia rozpusteného kyslíka udržiavala na hodnote najmenej 60 % ASV bez prevzdušňovania. Pri prietočných testoch sa odporúča, aby nasadené množstvo neprekročilo 0,5 g/l počas 24 hodín a nesmie nikdy prekročiť množstvo 5 g/l roztoku (2).

1.7.1.3. *Svetlo a teplota*

Fotoperióda a teplota majú byť vhodné na testované druhy (dodatky 2 a 3). Ak chceme monitorovať teplotu, je vhodné použiť ďalšiu testovaciu nádobu.

▼B

1.7.2. **Testované koncentrácie**

Obvykle sa vyžaduje päť koncentrácií testovanej látky s odstupom s konštantným faktorom nepresahujúcim 3,2. Pri výbere rozsahu testovaných koncentrácií, je potrebné brať do úvahy krivku vzťahujúcu LC_{50} na dobu expozície v štúdii akútnej toxicity. Za určitých okolností je vhodné použiť menej ako päť koncentrácií, napr. v limitných testoch a v užších koncentračných intervaloch. Koncentrácia látky vyššia ako 96 hodín LC_{50} alebo 100 mg/l a tá, ktorá z nich je nižšia, nemusí byť testovaná. Látky sa nemali testovať pod ich hranicou rozpustnosti v testovacej vode.

Ak sa použije činidlo zvyšujúce rozpustnosť, aby napomohlo pri príprave testovaných roztokov (pozri odsek 16.6.), jeho konečná koncentrácia v testovaných nádobách nemá byť vyššia ako 0,1 ml/l a nemala by byť rovnaká vo všetkých testovaných nádobách.

1.7.3. **Kontrola**

Jedna kontrolná nádrž zrieďovacej vody (replikát, paralela ak je to možné) a tiež, ak je to dôležité, jedna kontrolná nádrž obsahujúca činidlo zvyšujúce rozpustnosť (replikát, paralela, ak je to možné) sa musí zanalyzovať v dodatočnej testovacej sérii.

1.7.4. **Frekvencia analytických stanovení a meraní**

Koncentrácie testovanej látky sú stanovené v pravidelných časových intervaloch počas doby testu.

V semistatických testoch, kde sa očakáva, že koncentrácia zostane na ± 20 % nominálu (t. j. v rozsahu 80 – 120 %, pozri odseky 1.4 a 1.6.6), čo je odporúčané ako minimálna koncentrácia, najvyššie a najnižšie testované koncentrácie sa analyzujú, ak sú čerstvo pripravené a ihneď po výmene, najmenej trikrát v pravidelných časových odstupoch v priebehu testu (t. j. analýzy by sa mali vykonať na vzorkách z rovnakého roztoku, ak je tento čerstvo pripravený, a to pri výmene).

Pri testoch, kde sa neočakáva, že koncentrácia testovanej látky zostane na ± 20 % z nominálu (na základe údajov o stabilite látky), je potrebné analyzovať všetky testované koncentrácie pre čerstvo pripravené a vymenené roztoky, ale podľa rovnakého režimu (t. j. najmenej trikrát v pravidelných časových odstupoch v priebehu testu). Stanovenie koncentrácií testovanej látky pred výmenou je potrebné vykonať iba v jednej paralelnej (replikačnej) nádobe pre každú testovanú koncentráciu. Stanovenia je potrebné vykonať do siedmich dní po odbere vzoriek. Odporúča sa to pre prípad, že výsledky budú vychádzať z nameraných koncentrácií. Ak však záznamy dokazujú, že koncentrácia testovanej látky v roztoku bola uspokojivo udržiavaná v ± 20 % z nominálu alebo nameranej počiatočnej koncentrácie počas testu, potom výsledky môžu vychádzať z nominálu alebo nameranej počiatočnej hodnoty koncentrácie.

Na prietočné testy je vhodný podobný režim so vzorkami ako je uvedený na semistatické testy (ale meranie „starého“ roztoku nie je v tomto prípade možné). Ak však test trvá viac ako sedem dní, je možno vhodné zvýšiť počet vzorkovaní počas prvého týždňa, napr. tri série meraní, aby sa zistilo, že testované koncentrácie zostávajú nezmenené.

▼B

Vzorky si môžu vyžadovať odstreďovanie alebo filtrovanie za použitia filtra s pórmi veľkosti 0,45 μm. Pretože ani odstreďovanie ani filtrácia však vždy nedokážu odseparovať biologicky nedostupnú frakciu testovanej látky od tej, ktorá je biologicky dostupná, vzorky by mali byť podrobené spomínaným postupom.

Počas testu je potrebné merať rozpustený kyslík, pH a teplotu vo všetkých testovaných nádobách. Počas kontrol je vhodné merať celkovú tvrdosť vody a obsah solí v nádobe, a to v jednej nádobe s najvyššou koncentráciou. Rozpustený kyslík a obsah solí sa musí merať minimálne trikrát (na začiatku, v strede a na konci testu). Pri semistatických testoch sa odporúča meranie rozpusteného kyslíka s väčšou frekvenciou, najlepšie pred a po každej výmene vody alebo najmenej raz za týždeň. pH je potrebné merať na začiatku a konci každej výmeny vody pri semistatických testoch a najmenej raz týždenne pri prietočných testoch. Tvrdosť vody je vhodné merať raz počas trvania testu. Teplota sa meria denne a najlepšie je kontinuálne monitorovanie najmenej v jednej testovanej nádobe.

1.7.5. **Pozorovania**

1.7.5.1. *Štádium embryonálneho vývoja*

Embryonálne štádium (t. j. štádium gastrulí) na začiatku vystavenia testovanej látke musí byť čo najpresnejšie. Toto overenie sa môže urobiť použitím reprezentatívnej vzorky vajíčok vhodne chránených a vyčíslených. Pri opisovaní a ilustrácii embryonálnych štádií sa odporúča čerpať z odbornej literatúry (2), (5), (10), (11).

1.7.5.2. *Liahnutie a prežívanie*

Pozorovania liahnutia a prežívania by sa mali vykonávať najmenej raz za deň a je potrebné si zaznamenať počet vyliahnutých jednotlivcov. Na začiatku testu sa odporúča vykonávať pozorovania častejšie (napr. každých 30 minút počas prvých troch hodín), keďže v niektorých prípadoch časy prežitia môžu byť dôležitejšie ako iba počet uhynutých kusov (napr. ak sa vyskytujú akútne účinky toxicity). Mŕtve embryá a larvy treba odstrániť ihneď po objavení, pretože sa veľmi rýchlo rozkladajú. Mimoriadnu pozornosť treba venovať tomu, aby sme pri odstraňovaní mŕtvych jedincov neudreli alebo fyzicky nepoškodili susedné vajíčka/larvy, ktoré sú extrémne krehké a citlivé. Kritériá úhynu sa menia podľa vývojového štádia:

— **u vajíčok**: predovšetkým v ranných štádiách, výrazná strata priehľadnosti a zmeny v zafarbení, spôsobené koaguláciou a/alebo znížením proteínov, vedúcim k bielemu nepriehľadnému vzhľadu,

— **u embrií**: absencia telesného pohybu a/alebo absencia tepu srdca a/alebo nepriehľadné odfarbenie pri druhoch, ktorých embryá sú normálne priehľadné,

— **u lariev**: nepohyblivosť a/alebo neprítomnosť respiračných pohybov a/alebo neprítomnosť tepu srdca a/alebo biele nepriehľadné zafarbenie centrálneho nervového systému a/alebo strata reakcií na mechanické stimuly.

▼B

1.7.5.3. *Abnormálny vzhľad*

Počet lariev vykazujúcich abnormality vo forme tela a/alebo pigmentácie v štádiu absorpcie žĺtkového vaku sa zaznamenávajú v príslušných časových úsekoch v závislosti od dĺžky trvania testu a charaktere popísaných abnormalít. Treba poznamenať, že abnormálne embryá a larvy sa vyskytujú prirodzene a môžu byť v rozmedzí niekoľkých percent v kontrolných vsádkach pre niektoré druhy. Je nevyhnutné odstrániť abnormálne uhynuté druhy z testovaných nádob.

1.7.5.4. *Abnormálne správanie*

Abnormality ako napr. hyperventilácia, nekoordinované plávanie a netypická nehybnosť sa musia zaznamenávať v príslušných časových intervaloch, ktoré závisia od doby trvania testu. Tieto vplyvy, hoci ich je ťažké kvantifikovať, môžu (ak sú spozorované) pomôcť pri interpretácii údajov o mortalite t. j. poskytnúť údaje o spôsobe toxických účinkov látky.

1.7.5.5. *Dĺžka*

Na konci testu sa odporúča zmerať dĺžku jednotlivcov: štandardná, dĺžka rozdvojenia alebo celková dĺžka. Možno použiť všetky typy. Ak sa však vyskytne hnitie chvostovej plutvy alebo erózia plutvy, je možné použiť štandardné dĺžky. Všeobecne v dobre prebiehajúcom teste variačný koeficient pre dĺžku medzi replikami kontrolných meraní by mal byť ≤ 20 %.

1.7.5.6. *Hmotnosť*

Na konci testu je vhodné jednotlivé ryby odvážiť. Uprednostňovaná je suchá hmotnosť (24 hodín pri 60 °C) pred mokrou hmotnosťou (vysušené do sucha). Všeobecne v dobre prebiehajúcom teste variačný koeficient pre hmotnosť medzi replikami kontrolných meraní by mal byť ≤ 20 %.

Tieto pozorovania budú mať za následok niektoré alebo všetky z nasledujúcich údajov, využiteľné na štatistické analýzy:

— kumulovaná mortalita,

— počet zdravých lariev na konci testu,

— čas začiatku liahnutia a koniec liahnutia (t. j. 90 % vyliahnutých v každej replike),

— počet lariev vyliahnutých za deň,

— dĺžka (a hmotnosť) prežívajúcich zvierat na konci testu,

— počet lariev, ktoré sú zdeformované alebo abnormálneho vzhľadu,

— počet lariev vykazujúce abnormálne správanie.

▼B

2. **ÚDAJE A SPRÁVA**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Odporúča sa, aby sa štatistika začlenila aj do koncepcie a aj analýzy testu, keďže metóda pripúšťa mnohé variácie v koncepcii experimentu, ako napríklad v počte testovaných komôr, počte testovaných koncentrácií, v počiatočnom počte oplodnených vajíčok a v meraných parametroch. Špecifický návod na štatistické postupy nie je daný, vzhľadom na možnosti v koncepcii testov.

Ak sa odhadnú LOEC/NOEC, bude potrebné analyzovať variácie v každej sérií (skupine) použitím analýzy odchýlok (ANOVA) alebo použiť tabuľky neistôt. Aby bolo možné urobiť niekoľkonásobné pozorovanie medzi výsledkami pre jednotlivé koncentrácie a pre kontrolné nádrže, je vhodné použiť Dunnettovu metódu (12), (13). Vhodné príklady sú uvedené v (14), (15). Veľkosť účinku, detegovateľná použitím ANOVA alebo iných postupov (t. j. význam testu), sa vypočíta a zaznamená. Je potrebné poznamenať, že nie všetky pozorovania uvedené v odseku 1.7.5.6. sú vhodné na štatistickú analýzu metódou ANOVA. Napríklad kumulovaná mortalita a počet zdravých lariev na konci testu sa môžu analyzovať metódou pravdepodobnosti.

Ak sú odhadované LC/EC_x a) údajmi, ktoré nás zaujímajú, je vhodné ich znázorniť krivkou napr. logaritmickou, ktorej tvar zistíme použitím štatistických metód napr. metódy najmenších štvorcov alebo nelineárnej metódy najmenších štvorcov. Krivka by mala mať také parametre, aby LC/EC_x pri údajoch, ktoré sledujeme a ich štandardných odchýlkach mohli byť odhadnuté priamo. Toto významne potom uľahčí výpočet intervalov spoľahlivosti pre LC/EC_x. Ak neexistuje dobrý dôvod na výber iných konfidenčných intervalov, stanoví sa obojstranný 95 % konfidenčný interval. Krivka má byť položená tak, aby odchýlka od hodnôt bola priemerne odhadnutá. Môžu sa použiť aj grafické metódy prekladania kriviek. Regresná analýza je vhodná na všetky pozorovania uvedené v odseku 1.7.5.6.

2.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Výsledky by sa mali interpretovať pozorne, najmä ak namerané koncentrácie toxických látok v testovaných roztokoch dosahujú úrovne blízke detekčným limitom analytickej metódy. Interpretácia výsledkov pri koncentráciách nad hodnoty rozpustnosti daných látok vo vode si taktiež vyžaduje obozretnosť.

2.3. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí obsahovať nasledujúce informácie:

2.3.1. **Testovaná látka**

— fyzikálny charakter a dôležité fyzikálno-chemické vlastnosti,

— identifikačné chemické údaje, zahŕňajúce čistotu a analytickú metódu na kvantifikáciu testovanej látky, ak je to vhodné.

▼B

2.3.2. **Testované druhy**

— vedecký názov, rod, počet rodičovských rýb (t. j. koľko samíc bolo použitých, aby sa získal pre test vyžadovaný počet), zdroj a metóda zberu oplodnených vajíčok a nasledujúca manipulácia.

2.3.3. **Podmienky testu:**

— použitá testovacia procedúra (t. j. semistatická alebo prietočná metóda, časový úsek od oplodnenia po štart testu, vsadené množstvo atď.),

— fotoperiódy,

— koncepcia testu (t. j. počet testovaných komôr a replík, počet embryí v replike),

— metóda prípravy zásobných roztokov a frekvencia obnovy (činidlo zvyšujúce rozpustnosť a jeho koncentrácia, ak bolo použité, musí byť udané),

— nominálne testovacie koncentrácie, namerané hodnoty, ich priemery a ich štandardné odchýlky v testovaných nádobách a metóda, ktorou boli získané a ak je testovaná látka rozpustná vo vode v koncentráciách pod tými, ktoré boli testované, mali by byť uvedené poznámky o tom, že merania referujú o koncentráciách testovanej látky v roztoku,

— charakteristiky zrieďovacej vody: pH, tvrdosť vody, teplota, koncentrácia rozpusteného kyslíka, úroveň zostatkového chlóru (ak bola zmeraná), celkový organický uhlík, suspendované látky, salinita v testovanom prostredí (ak bol meraný) a iné vykonané merania,

— kvalita vody v testovaných nádobách: pH, tvrdosť vody, teplota a koncentrácia rozpusteného kyslíka.

2.3.4. **Výsledky:**

— výsledky z predbežných štúdií stability testovanej látky,

— záznamy, že v kontrolných nádobách boli splnené požiadavky na akceptovanie úhrnného prežívania testovaných druhov počas testu (dodatok 2 a 3),

— dátum úmrtia alebo prežitia v embryonálnom a larválnom štádiu a úhrnná úmrtnosť alebo prežitie,

— deň vyliahnutia a počet vyliahnutých jedincov,

— údaje o dĺžke (a hmotnosti),

— rozsah a opis morfologických abnormalít, ak sa nejaké vyskytli,

— rozsah a opis účinkov na správanie, ak sa nejaké vyskytli,

— štatistická analýza a spracovanie údajov

— pri testoch analyzovaných za použitia ANOVA metódy – najnižšie zistená účinná koncentrácia (LOEC) pri p = 0,05/- a nezistená účinná koncentrácia (NOEC) pri predpokladanom účinku, zahŕňajúca popis štatistických postupov a predpoklad, aký veľký účinok je možné detegovať,

▼B

— pri testoch analyzovaných regresnými technikami LC/ECx a intervaly spoľahlivosti, grafy preložených modelov, ktoré boli použité na ich výpočty,

— vysvetlenie pri všetkých odchýlkach od tejto testovacej metódy.

3. **POUŽITÁ LITERATÚRA**

(1) Kristensen P. (1990). Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, 60 pp. June 1990.

(2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 s.

(3) Brauhn J. L. and Schoettger R. A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.

(4) Brungs W. A. and Jones B. R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures, s. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.

(5) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, s. 121 – 173.

(6) Legault R. (1958). A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, s. 328 – 330.

(7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J. E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, s. 61 – 71.

(8) Birge J. W., Black J. A. and Westerman A. G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, s. 807 – 821.

(9) Van Leeuwen C. J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986). Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. III. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). J. Aquatic Toxicology, 9, s. 129 – 145.

(10) Kirchen R. V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.

(11) Kirchen R. V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 s.

(12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, s. 1096 – 1121.

(13) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, s. 482 – 491.

(14) Mc Clave J. T., Sullivan J. H. and Pearson J.G (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼B

(15) Van Leeuwen C. J., Adema D. M. M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. Aquatic Toxicology, 16, pp. 321 – 334.

(16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, 81 s.

(17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch, of Environmental Contamination and Toxicology, 21, s. 126 – 134.

(18) Meyer A., Bierman C. H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology S an invitation to the comperative methods. Proc. Royal Society of London, Series B, 252: s. 231 – 236.

(19) Ghillebaert F., Chaillou C, Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety 32, s. 19 – 28.

(20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (*Oryzias latipes*). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.

(22) De Graeve G. M., Cooney J. D., McIntyre D. O., Poccocic T. L., Reichenbach N. G., Dean J. H. and Marcus M. D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (*Pimephales promelas*) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. Environ. Tox. Chem. 10, s. 1189 – 1203.

(23) Calow P. (1993). Handbook of Ecotoxicology, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.

(24) Balon E. K. (1985). Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives, Junk Publ., Dordrecht, 280 s.

(25) Blaxter J. H. S. (1988). Pattern and variety in development, in: W. S. Hoar and D. J. Randall eds., Fish Physiology, Vol. XIA, Academic press, pp. 1 – 58.

Tabuľka 1A

Odporučené druhy rýb na testovanie

Sladkovodné ryby
Oncorhynchus mykiss
Pstruh dúhový (9)(16)
Danio rerio
Zebrička(7)(17)(18)
Cyprinus caprio
Kapor obyčajný (8)(19)
Oryzias latipes
Ryžová rybka/Medaka (20)(21)
Pimephales promelas
Fathead minnow (8)(22) – malá kaprovitá ryba

▼B

Tabuľka 1B

Príklady iných dobre zdokumentovaných druhov rýb, ktoré sa tiež používajú na testovanie

SLADKOVODNÉ RYBY	MORSKÉ RYBY
Carassius auratus Karas zlatý (8)	*Menidia peninsulae* Tidewater silverside – malá morská ryba druhu Menidia peninsulae (23)(24)(25)
Lepomis macrochirus Pleskáč silný (8)	*Clupea harensus* Sleď druhu Clupea harengus (24)(25)
	Gadus morhua Treska druhu *Gadus morhua* (24)(25)
	Cyprinodon variesatus Sheepshead minnow – malá morská ryba druhu Cyprinodon variegatus (23)(24)(25)

▼B

DODATOK 1

NÁVOD NA VYKONANIE TESTU TOXICITY NA EMBRYÁCH A PLODOVOM VAKU – POTERI U ZEBRIČIEK *(Brachydanio rerio)*

ÚVOD

Zebrička pochádza z Koromandelského pobrežia v Indii, kde osídľuje rýchlo prúdiace toky. Je to bežná akvarijná rybka z rodu kaprovitých a informácie ojej ošetrovaní a chovaní možno nájsť v študijných príručkách o tropických rybách. Ich biológiu a použitie vo výskume rýb vo svoje práci popísal Laaleom (1).

Ryba výnimočne dosahuje dĺžku 45 mm. Telo má valcovité so 7 – 9 tmavomodrými striebristými pásikmi. Tieto pásiky sa tiahnu od chrbtovej po análnu plutvu. Chrbát je olivovo-zelený. Samčekovia sú štíhlejší ako samičky. Samičky sú striebristej ši e a ich bruško je vyduté, predovšetkým pred trením.

Dospelé ryby sú schopné znášať veľké rozdiely v teplote, pH a tvrdosti vody. Aby sme však získali zdravé ryby, ktoré produkujú vajíčka dobrej kvality, je potrebné dodržiavať optimálne podmienky.

Počas trenia samček zachytí samičku a spojí sa s ňou, táto potom vypudí oplodnené vajíčka. Vajíčka, ktoré sú priehľadné a nepriľnavé, padajú na dno, kde ich môžu ich rodičia zožrať. Na ich trenie má vplyv svetlo. Ak je ranné svetlo dostatočné, ryby sa trú v skorých ranných hodinách, hneď po úsvite.

Samičky môžu v týždenných intervaloch vyprodukovať sériu niekoľkých stoviek vajíčok.

PODMIENKY PRE RODIČOVSKÉ RYBY, REPRODUKČNÉ RYBY A VÝVOJOVÉ ŠTÁDIÁ ŽIVOTA RÝB

Vyberte vhodný počet zdravých rýb a držte ich v príslušnej kvalite (napr. dodatok 4) najmenej dva týždne pred očakávaným trením. Skupine rýb by sa malo umožniť vytrieť najmenej raz pred vyprodukovaním série vajíčok prežitých v teste. Hustota rýb počas tohto obdobia by nemala presiahnuť 1 gram ryby na liter vody. Ak sa pravidelne vymieňa voda alebo sa používajú systémy na čistenie vody, potom môže byť hustota rýb vyššia. Je potrebné udržiavať stálu teplotu v chovných nádržiach a to hodnoty 25 °C ± 2 °C. Ryby sa kŕmia rôznou potravou, ktorá môže pozostávať napríklad z komerčnej suchej potravy, živých, čerstvo vyliahnutých Arthémií, chironomných dafnií, bielych červov (Enchytraeid).

Dva postupy, ktoré sú uvedené nižšie, v praxi vedú k získaniu dostatočného množstva zdravých oplodnených vajíčok použiteľných na test:

i) Osem samičiek a 16 samčekov sa umiestni do nádrže obsahujúcej 50 l zrieďovacej vody, zabezpečia sa pred priamym svetlom a nechajú sa neručene najmenej 48 hodín. Trecia podložka je umiestnená na dno akvária poobede, deň pred štartom testu. Trecí tanier pozostáva z rámu (z plexiskla alebo iného vhodného materiálu), výšky 5 – 7 cm s hrubou sieťovinou 2 – 5 mm veľkosť oka, zachytenou na vrchu s jemnou sieťovinou s 10 – 30 μm veľkosť oka na dne. Počet „trecích stromov“, pozostávajúcich z netočiacich sa nylonových laniek, je uchytených na hrubej sieťovine v ráme. Potom, čo ryby boli držané 12 hodín v tme, zažneme slabé svetlo, ktoré iniciuje trenie. Trecí tanier je po dvoch až štyroch hodinách po trení odstránený spolu so zozbieranými vajíčkami. Trecí tanier zabraňuje rybám požierať vajíčka a súčasne dovoľuje ľahký zber vajíčok. Skupine rýb by sa mala vytrieť najmenej raz pred trením, z ktorého vajíčka budú použité v teste.

▼B

ii) Od 5 do 10 samcov a samičiek rýb je individuálne držaných najmenej dva týždne pred zamýšľaným trením. Po 5 – 10 dňoch budú bruška samičiek vypuklé a ich genitálne papily budú viditeľné. Samčeky sú bez papíl. Trenie sa uskutoční v trecích nádržiach vybavených falošným sieťovaným dnom (ako bolo popísané vyššie). Nádrž je naplnená zrieďovacou vodou tak, že hĺbka vody nad sieťou je 5 – 10 cm. Jedna samička a dvaja samčekovia sú umiestnení do nádrže jeden deň pred zamýšľaným trením. Teplotu vody postupne zvyšujeme na teplotu o 1 stupeň vyššiu ako bola aklimatizačná teplota. Svetlo je vypnuté a nádrž zostáva ničím nerušená. Ráno je zapnuté slabé svetlo, ktoré vyvolá trenie. Po 2 – 4 hodinách sú ryby odstránené a vajíčka sa zozbierajú. Ak je potrebné získať od jednej samičky veľký počet sérií vajíčok, potom sa pripraví dostatočný počet paralelných trecích nádrží. Podľa záznamov o reprodukčných výsledkoch jednotlivých samičiek pred testom (veľkosť série a kvalita), môžu byť tieto samičky s najvyššou reprodukciou vybrané ako chovné.

Vajíčka by mali byť prenesené do testovacích nádob sklenenými trubicami/-vnútorný priemer nie menší ako 4 mm/vybavené sacou bankou – balónikom. Množstvo vody obklopujúce prenášané vajíčka má byť čo najmenšie. Vajíčka sú ťažšie ako voda a vypadávajú z trubky. Vajíčka (larvy) je potrebné chrániť pred stykom so vzduchom. Mikroskopické skúmanie vzoriek zo sérií má dbať na to, aby sa nevyskytli žiadne neregulárnosti v prvom vývojovom štádiu. Dezinfekcia vajíčok nieje povolená.

Miera úmrtnosti vajíčok je najvyššia v prvých 24 hodinách po oplodnení. Počas tohto obdobia je vždy vykazovaná mortalita 5 – 40 %. Degenerujúce vajíčka sú výsledkom neúspešného oplodnenia alebo vývojových porúch. Zdá sa, že série vajíčok závisia od samičky ryby, tak ako niektoré samičky sústavne produkujú vajíčka dolnej kvality, iné nikdy. Tiež vývojový pomer a miera liahnutia sa mení od jednej série ku druhej. Úspešne oplodnené vajíčko a žĺtkový vačok lariev prežívajú dobre, normálne okolo 90 %. Pri 25 °C vajíčka sa vyliahnu 3 – 5 dní po oplodnení a žĺtkový vačok sa absorbuje priebežne do 13 dní po oplodnení.

Embryonálny vývoj bol veľmi dobre definovaný Hisaokom a Batťlom (2). Cestou priehľadnosti vajíčok a počtom vyliahnutých lariev môžeme sledovať vývoj rýb a zistiť prítomnosť malformácií. Približne po štyroch hodinách od oplodnenia je možné odlíšiť neoplodnené vajíčka od oplodnených (3). Pri tomto testovaní sú vajíčka a larvy umiestnené do testovacích nádob s malým objemom a sú skúmané pod mikroskopom.

Testované podmienky, ktoré uplatňujeme na ranné štádiá života, sú v zozname v dodatku 2. Optimálne hodnoty pH a tvrdosť zrieďovacej vody sú pH 7,8 a 250 mg $CaCO_3$/l.

VÝPOČTY A ŠTATISTIKA

Navrhuje sa dvojfázový prístup. Po prvé, údaje o úmrtnosti, abnormálnom vývoji a čase liahnutia sa štatisticky analyzujú. Ak pri koncentráciách nebol detegovaný žiadny účinok, štatisticky sa vyhodnotí dĺžka tela. Tento prístup je vhodný, ak toxická látka môže selektívne zabíjať malé ryby, zadržať čas liahnutia a vyvolávať všeobecné malformácie, takže vedú k meraniam dĺžky s odchýlkami. Okrem toho, zmeria sa približne rovnaký počet rýb pre každý spôsob spracovania, aby sa zabezpečila validita štatistiky daného testu.

▼B

STANOVENIE LC_{50} A EC_{50}

Percento prežívajúcich vajíčok a lariev sa vypočíta a koriguje vzhľadom na mortalitu v kontrolnom stanovení podľa Abbottovho vzorca (4):

$$P = 100 - \left(\frac{C - P}{C} \times 100 \right)$$

kde:

P = korigované % prežívajúcich

P' = % prežívajúcich zistené pri testovanej koncentrácií

C = prežívajúce pri kontrolnom stanovení

Ak je to možné, LC_{50} sa stanoví vhodnou metódou na konci testu.

Ak sa vyžaduje zahrnutie morfologických abnormalít do štatistiky pre EC_{50}, potom návod môžeme nájsť v Stephanovi (5).

ODHAD LOEC A NOEC

Objektívny test vajíčok a plodový vak – poter porovnávaný s nenulovou koncentráciou pri kontrolnom stanovení – stanoví sa LOEC. Z toho dôvodu môžu byť užitočné násobné porovnávacie postupy (6), (7), (8), (9), (10).

POUŽITÁ LITERATÚRA

(1) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (Brachydanio rerio) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Fish Biol. 10, s. 121 – 173.

(2) Hisaoka K. K. and Battle H. I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish Brachydanio rerio (Hamilton-Buchanan) J. Morph., 102, 311 s.

(3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebrabärbling (Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan). Journal of Applied Ichthyology, 2, s. 173 – 181.

(4) Finney D. J. (1971). Probit Analysis, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp. 1 – 333.

(5) Stephan C. E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766, J. G. Pearson, R. B. Foster and W. E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, s. 69 – 81.

(6) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, s. 1096 – 1121.

(7) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482 – 491.

(8) Williams D. A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. Biometrics, 27, s. 103 – 117.

(9) Williams D. A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. Biometrics 28, s. 519 – 531.

(10) Sokal R. R. and Rohlf F. J. (1981). Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research, W. H.Freeman and Co., San Francisco.

DODATOK 2

PODMIENKY A TRVANIE TESTU A KRITÉRIÁ NA PREŽITIE U ODPORUČENÝCH DRUHOV RÝB

Druh rýb	Teplota (°C)	Obsah solí (0/00)	Fotoperióda (hod.)	Trvanie štádia (DNI)		Typická dĺžka testu	Zostatok po kontrole (minimum prežitých %)	
				Embryo	Plodový vačok – poter		Úspešne vyliahnuté	Po vyliahnutí
SLADKOVODNÉ								
Bracydanio rerio Zebrička	25 ± 1	—	12 – 16	3 – 5	8 – 10	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 5 dní po vyliahnutí (8 – 10 dní)	80	90
Oncorhynchus mykiss Pstruh dúhový	10 ± 1 (1) 12 ± 1 (2)	—	0 (a)	30 – 35	25 – 30	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 20 dní po vyliahnutí (50 – 55 dní)	66	70
Cyprinus carpio Kapor obyčajný	21 – 25	—	12 – 16	5	> 4	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 4 dní po vyliahnutí (8 – 9 dní)	80	75
Oryzias latipes Ružová rybka/Medaka	24 ± 1 (1) 23 ± 1 (2)	—	12 – 16	8 – 11	4 – 8	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 5 dní po vyliahnutí (13 – 16 dní)	80	80
Pimephales promelas Fathead minnow – malá kaprovitá ryba	25 ± 2	—	16	4 – 5	5	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 4 dní po vyliahnutí (8 – 9 dní)	60	70

(1) U embrií.
(2) U lariev.
(a) Embryá a larvy sa musia až do obdobia jedného týždňa po vyliahnutí držať v tme (mimo kontrolných časov). Počas trvania testu sa držia pri tlmenom osvetlení.

DODATOK 3

Podmienky a trvanie testu a kritériá na prežitie u ostatných dobre zdokumentovaných druhov rýb

Druh rýb	Tepl ota (°C)	Obsah soli (0/00)	Foto perióda (hod.)	Trvanie štádia (dni)		Typická dĺžka testu	Zostatok po kontrole (minimum prežitých %)	
				Embryo	Plodový vačok – poter		Úspešne vyliahnuté	Po vyliahnutí
SLADKOVODNÉ RYBY								
Carassius auratus Karas zlatý	24 ± 1	—	—	3 – 4	> 4	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 4 dní po vyliahnutí (7 dní)	—	80
Leopomis macrochirus Pleskáč silný	21 ± 1	—	16	3	> 4	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 4 dní po vyliahnutí (7 dní)	—	75
MORSKÉ RYBY								
Menidia peninsulae Tidewater silverside – malá morská ryba	22 – 25	15 – 22	12	1,5	10	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 5 dní po vyliahnutí (6 – 7 dní)	80	60
Clupea harengus Sleď druhu	10 ± 1	8 – 15	12	20 – 25	3 – 5	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 3 dní po vyliahnutí (23 – 27 dní)	60	80
Gadus morhua Treska druhu	5 ± 1	5 – 30	12	14 – 16	3 – 5	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 3 dní po vyliahnutí (18 dní)	60	80
Cyprinodon variegatus Sheepshead minnow – malá morská ryba druhu	25 ± 1	15 – 30	12	—	—	Čo najskôr po oplodnení (rané štádium gastrulí) do 4/7 dní po vyliahnutí (28 dní)	> 75	80

▼B

DODATOK 4

NIEKTORÉ CHARAKTERISTIKY VODY VHODNEJ NA RIEDENIE

LÁTKA	KONCENTRÁCIE
Látka v časticiach	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Zlúčený amoniak	< 1 µg/l
Zostatkový chlór	< 10 µg/l
Celkové organofosfátové pesticídy	< 50 ng/l
Celkové organochlórované pesticídy plus polychlórované bifenyly	< 50 ng/1
Celkový organický chlór	< 25 ng/1

▼B

C.16. **VČELY OBECNÉ – AKÚTNY TEST ORÁLNEJ TOXICITY**

1. **METÓDA**

Táto metóda akútneho toxikologického testu je totožná s metódou OECD TG 213 (1998)

1.1. ÚVOD

Tento toxikologický test je laboratórna metóda navrhnutá na stanovenie orálnej akútnej toxicity aplikovaných chemických látok pri ochrane dospelých včiel robotníc.

Pri stanovení a vyhodnocovaní toxických charakteristík látok sa určenie akútnej a orálnej toxicity u včiel môže požadovať všade tam, kde je napr. možná expozícia včiel danou chemikáliou. Akútny orálny test toxicity sa vykonáva s cieľom zistenia vrodenej toxicity pesticídov a iných chemikálii voči včelám. Výsledky testu je možné použiť na definovanie potreby na následné vyhodnotenie. Túto metódu je možné použiť najmä v postupných krokových – odborných programoch, zameraných na zistenie nebezpečenstva vplyvu pesticídov na včely, založených na postupnom progrese od laboratórnych testov toxicity cez semipoľné až ku poľným – terénnym pokusom (1). Pesticídy môžu byť testované ako aktívne látky (a. s.) alebo ako viazané produkty.

Toxický štandard sa dá použiť na overenie citlivosti včiel a presnosť testovacieho postupu.

1.2. DEFINÍCIE

Akútna orálna toxicita: sú nepriaznivé účinky, ktoré sa dostavia maximálne do 96 hodín po orálnom podaní jednej dávky testovanej látky.

Dávka: je množstvo skonzumovanej testovanej látky a je vyjadrená ako hmotnosť (ug) testovanej látky na testovaného živočícha (μg/-včelu). Skutočná dávka sa nedá vypočítať pre každú včelu individuálne vzhľadom na spoločné kŕmenie, ale je možné vyjadriť priemernú dávku (celkovo skonzumovaná testovaná látka/počet testovaných včiel v jednom úli).

LD_{50} (stredná letálna dávka) orálna: je štatisticky odvodená hodnota jednej dávky látky, po ktorej dochádza k úhynu 50 % testovaných živočíchov po podaní orálnou cestou. Hodnota LD_{50} je vyjadrená v (μg) testovanej látky na včelu. Pre pesticídy môže byť testovaná látka aj v aktívnej forme (a. s.), ale aj vo forme viazanej, a to ako produkt obsahujúci viac ako jednu účinnú látku.

Mortalita: úhyn živočícha sa konštatuje v prípade jeho kompletnej imobility.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Dospelé robotnice včiel obecných (*Apis mellifera)* sú vystavené celému radu dávok testovanej látky, ktorá je rozptýlená v roztoku sacharózy. Potom sa včely kŕmia rovnakou stravou, ktorá neobsahuje testovanú látku. Úmrtnosť sa zaznamenáva denne najmenej 48 hodín a porovnáva sa s kontrolnými hodnotami. Ak sa úmrtnosť zvýši medzi 24 až 48 hodinami, kým kontrolná úroveň úmrtnosti zostáva na akceptovateľnej hladine, t. j. menej alebo rovných 10 %, je vhodné predĺžiť trvanie testu maximálne na 96 hodín. Výsledky sa analyzujú, aby sa mohla vypočítať hodnota LD_{50} za 24 hodín a 48 hodín a v prípade predĺženia štúdie aj za 72 hodín a 96 hodín.

▼B

1.4. VALIDITA TESTU

Ak má byť test platný, musia platiť nasledovné podmienky:

— priemerná úmrtnosť na celkový počet kontrol nesmie prekročiť 10 % na konci testu,

— hodnota LD_{50} toxického štandardu musí spĺňať špecifikovaný rozsah.

1.5. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.5.1. **Výber včiel**

Mali by sa použiť mladé robotnice rovnakého druhu (t. j. včely rovnakého veku, včely rovnako stravované, atď. Včely by sa mali odobrať z primeraného kŕmeného, zdravého chovu a ak je to možné, z chovu nezasiahnutého chorobami a z kolónie s kráľovnou s overeným pôvodom a fyziologickým stavom. Včely by sa mali vyberať ráno pred použitím alebo večer pred testovacím dňom a potom by sa mali udržiavať v týchto podmienkach až do nasledujúceho dňa. Vhodné sú včely odobrané z rámov, bez mláďat. Malo by sa vyvarovať odoberaniu včiel skoro na jar alebo neskoro na jeseň, keďže v tomto období sa včelám mení ich fyziológia. V prípade, že sa predsa test musí vykonať počas skorej jari alebo neskorej jesene, včely môžu byť v prípade núdze premiestnené do inkubátora a počas jedného týždňa sa budú kŕmiť včelím chlebom (peľ zozbieraný z plástov) a roztokom sacharózy. Včely liečené chemickými látkami ako sú antibiotiká, antivarroa produktmi, atď. by sa nemali použiť na toxikologický test po dobu štyroch týždňov od poslednej liečby.

1.5.2. **Podmienky kŕmenia a chovu včiel**

Vhodné sú úle s ľahkým čistením a dobrým vetraním. Je možné použiť ľubovoľný vhodný materiál ako je napr.: nehrdzavejúca oceľ, pletivo, plastické alebo drevené úle. Je vhodné umiestniť skupinu 10 včiel do jedného úľa. Veľkosť testovacích úľov by mala byť úmerná počtu včiel, t. j. aby bol zabezpečený dostatočný priestor.

Včely sa majú držať v tme, v miestnosti určenej na pokusy pri teplote 25 ± 2 °C. Relatívna vlhkosť, normálne okolo 50 – 70 %, by mala byť zaznamenávaná počas doby trvania testu. Manipulovanie vrátane liečby a pozorovania sa môžu uskutočňovať za denného svetla. Ako potrava sa použije roztok sacharózy vo vode s konečnou koncentráciou 500 g/l (50 % objemových). Po podaní testovacích dávok by sa mala strava podávať *ad libitum*. Spôsob kŕmenia by mal umožňovať zaznamenanie podávanej stravy pre každý testovací úľ (pozri časť 1.6.3.1). Je možné použiť sklenenú trubicu (približne 50 mm dlhú a 10 mm širokú s otvoreným zúženým koncom okolo 2 mm v priemere)

1.5.3. **Príprava včiel**

Zozbierané včely sú náhodne rozmiestnené do testovacích úľov, ktoré sú náhodne rozmiestnené v experimentálnej miestnosti.

▼B

Pred začatím testu by sa mali včely nechať vyhladovať aspoň dve hodiny pred začiatkom testu. Odporúča sa, aby včely neprijímali potravu, t. j. aby ich obsah čriev pred začatím testu bol rovnaký. Umierajúce včely je pred začiatkom testu potrebné nahradiť zdravými.

1.5.4. **Príprava dávok**

Ak je testovaná látka miešateľná s vodou, môže sa rozptýliť priamo v 50 % roztoku sacharózy. V prípade technických produktov a látok s nízkou rozpustnosťou vo vode, akými sú napríklad organické rozpúšťadlá, emulsifikátory alebo disperzné činidlá s nízkou toxicitou na včely môže byť použitý napr. acetón, dimethylformamid, dimetylsulfoxid. Koncentrácia rozpúšťadla závisí od rozpustnosti testovanej látky a mala by byť rovnaká pre všetky testované koncentrácie. Aj keď koncentrácia rozpúšťadla o hodnote 1 % je v zásade prijateľná, nemala by sa prekročiť.

Mali by sa pripraviť vhodné kontrolné roztoky, t. j. roztoky, v ktorých rozpúšťadlo alebo disperzné činidlo rozpustí testovanú látku. Použijú sa dve oddelené kontrolné skupiny: vodný roztok a sacharózový roztok rozpúšťadlom/nosičom v koncentrácii použitej v dávkovacích roztokoch.

1.6. POSTUP

1.6.1. **Test a kontrolné skupiny**

Počet dávok a ich opakovaní by mal spĺňať štatistické požiadavky na stanovenie LD_{50} s 95 % pravdepodobnosťou. Bežne sa pre tento test požaduje päť dávok v geometrickom rade s faktorom nepresahujúcim 2,2 pre daný rozsah LD_{50}. Zrieďovací faktor a počet dávkovaní rôznych koncentrácií sa musí stanoviť vo vzťahu ku strmosti krivky toxicity (dávka versus úmrtnosť), je potrebné vziať do úvahy štatistickú metódu, ktorá bola zvolená na analýzu výsledkov. Výber rozsahu pre test umožní vybrať vhodné koncentrácie dávkovanej látky.

Minimálne tri testovacie skupiny, každá po desiatich včelách, by mali byť kŕmené testovanou látkou na každú skúmanú koncentráciu. Minimálne tri kontrolné skupiny, každá po desiatich včelách, by mali prebiehať súbežne s testovanými sériami. Kontrolné skupiny by mali byť tiež zaradené pre použité rozpúšťadlo/nosič (pozri časť 1.5.4).

1.6.2. **Toxický štandard**

Do testovacích sérií je potrebné zahrnúť toxický štandard. Následne sa vyselektujú aspoň tri dávky, aby sa dosiahla očakávaná hodnota LD_{50}. Pri každej testovanej dávke by sa mali použiť minimálne tri úle, každý po desiatich včelách. Preferovaný štandard toxicity je dimetoát, pre ktorý je zaznamenaná hodnota LD_{50} za 24 hodín v rozmedzí 0,10 – 0,35 µg a. s. /včelu (2). Aj iné štandardy toxicity budú akceptovateľné tam, kde sa dá získať dostatočné množstvo údajov na overenie očakávanej odozvy dávky (napr. parathion).

▼B

1.6.3. **Expozícia**

1.6.3.1 *Podávanie dávok*

Každej testovanej skupine včiel sa bude podávať 100 – 200 µl vodného roztoku 50 % sacharózy, ktorý obsahuje testovanú látku primeranej koncentrácie. V prípade látok s nízkou rozpustnosťou, nízkou toxicitou alebo nízkou koncentráciou vo viazanej forme sa vyžaduje väčšie množstvo testovanej látky v sacharózovom roztoku. Skonzumované množstvo potravy je potrebné monitorovať u každej skupiny včiel. Ak je krmivo s testovanou látkou skŕmené (obyčajne v intervale 3 – 4 hodín), zvyšok krmiva sa z testovacieho úľa odoberie a nahradí sa krmivom obsahujúcim iba sacharózový roztok. Sacharózový roztok sa potom podáva *ad libitum*. Pri niektorých zlúčeninách podávaných vo vyšších koncentráciách sa môže prejaviť znížené alebo žiadne prijímanie potravy ako dôsledok zvýšenej koncentrácie. Po maximálne 6 hodinách sa neskonzumované krmivo odoberie a nahradí roztokom sacharózy. Množstvo skonzumovanej potravy sa zaznamená (meranie objemu/hmotnosť zostatkovej potravy).

1.6.3.2. *Trvanie testu*

Na trvanie testu sa uprednostňuje doba 48 hodín, po ktorej sa testovaný roztok nahradí samotným roztokom sacharózy. Ak vzostup úmrtnosti včiel pokračuje a prekročí hodnotu 10 % počas prvých 24 hodín, trvanie testu by malo byť predĺžené na maximálne 96 hodín, za predpokladu, že kontrola úmrtnosti včiel neprekročí 10 %.

1.6.4. **Pozorovania**

Úmrtnosť sa zaznamenáva po 4 hodinách od začiatku testu a potom po 24 hodinách a po 48 hodinách (po podaní testovacej dávky). Ak je potrebný predĺžený čas pozorovania, ďalšie hodnotenie by malo prebehnúť v 24 hodinových intervaloch, avšak maximálne do celkových 96 hodín na dôkaz toho, že úmrtnosť včiel neprekročí stanovených 10 %.

Je potrebné zaznamenať aj množstvo skonzumovanej testovacej látky na skupinu včiel. Porovnaním hodnôt skonzumovanej a neskonzumovanej potravy počas 6 hodín sa získajú informácie o stráviteľnosti poskytnutej potravy.

Všetky abnormálne prejavy správania sa včiel počas testovaného obdobia by mali byť zaznamenané.

1.6.5. **Limitný test**

V niektorých prípadoch (napr. za predpokladu, že testovaná látka má nízku toxicitu) je možné vykonať limitný test 100 µg a. s. /včelu s cieľom dokázať, že hodnota LD_{50} je väčšia ako uvedená hodnota. Rovnaký postup by sa mal použiť vrátane troch opakovaní testu na danú testovanú látku, aj na relevantnú kontrolu, na zistenie množstva skonzumovanej potravy a pri použití toxických štandardov. V prípade mortality sa celá štúdia prepracuje. Ak sa spozorujú subletálne účinky (pozri časť 1.6.4.), aj tieto je potrebné zaznamenať.

▼B

2. **ÚDAJE A SPRÁVA**

2.1. ÚDAJE

Údaje sa zosumarizujú do tabuľkovej formy, pre každú pokusnú skupinu zvlášť, tak isto aj pre kontrolnú skupinu včiel a skupinu použitú na zistenie toxického štandardu, pre počet použitých včiel, úmrtnosť v každom období pozorovania a pre počet včiel so zmeneným správaním. Údaje mortality je potrebné analyzovať vhodnými štatistickými metódami (napr. probitová analýza, pohyblivý priemer, binominálna pravdepodobnosť) (3), (4). Grafické záznamy dávok a ich odoziev by mali byť zaznamenané formou kriviek, a to v každý odporúčaný čas pozorovania na výpočet sklonu strmosti kriviek a stredných smrteľných dávok (LD_{50}) s 95 % pravdepodobnostnými limitami. Opravy týkajúce sa kontroly úmrtnosti sa vykonajú za pomoci Abbottových korekcií (4), (5). Tam, kde nebola úplne skonzumovaná použitá potrava, zaznamenajú sa skonzumované testovacie dávky na skupinu včiel. Hodnota LD_{50} by mala byť vyjadrená v μg testovanej látky na včelu.

2.2. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí obsahovať nasledujúce informácie:

2.2.1. **Testované látky:**

— fyzikálna podstata a relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti (ako napr.: stabilita – odolnosť vo vode, tlak pár),

— identifikačné chemické údaje, vrátane štruktúrneho vzorca, čistota (napr. pesticídov, identitu a koncentráciu účinnej látky alebo látok).

2.2.2. **Testované druhy:**

— odborný názov, druh, približný vek (v týždňoch), metóda zberu, dátum zberu,

— informácie o kolónach použitých na zber testovaných včiel, vrátane zdravotného stavu, všetkých chorôb týkajúcich sa dospelého včelstva, všetky preliečenia, atď.

2.2.3. **Podmienky testu**

— teplota a relatívna vlhkosť experimentálnej miestnosti,

— podmienky chovu včiel, vrátane typu, veľkosti a materiálu testovacích úľov,

— metóda prípravy zásobných roztokov a frekvencia prípravy nových roztokov (rozpúšťaná látka a jej koncentrácia sa musí v prípade použitia uviesť),

— koncepcia testu, napr. použitý počet a testovacie koncentrácie, počet kontrol pre každú testovanú koncentráciu a kontrolu, počet kópií testovacích úľov a počet včiel na testovaný úľ,

— dátum testu.

▼B

2.2.4. **Výsledky:**

— výsledky predbežného výberu rozsahu štúdie, ak bol výber uskutočnený,

— nespracované údaje: úmrtnosť pri každej testovanej dávke, pri každom pozorovanom čase,

— graf udávajúci závislosť, dávka a odozva na konci každého testu,

— hodnoty LD_{50} s 95 % pravdepodobnosťou limitu pre každý odporúčaný čas pozorovania, pre testovanú látku a toxický štandard,

— štatistické postupy použité na určenie LD_{50},

— úmrtnosť pri kontrolách,

— iné biologické dopady pozorované alebo merané, ako napr.: abnormálne správanie sa včiel (vrátane odmietnutia testovacej dávky potravy), pomer skonzumovanej potravy v skupinách včiel testovaných a netestovaných,

— akékoľvek odchýlky od testovacích postupov tu uvedených a všetky dostupné, relevantné informácie.

3. **POUŽITÁ LITERATÚRA:**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision – Making Scheme for the Enviromental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO Bulletin, Vol.23, N.1, s. 151 – 165. March 1993.

(2) Gough, H.J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B.(1994). The use of dimethoat as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981 – 1992. Journal of Apicultural Research, 22, s. 119 – 125

(3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method ef evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., pp. 99 – 113

(4) Finney, D.J. (1971). Probit analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York

(5) Abbott, W.S.(1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, s. 265 – 267.

▼B

C.17. VČELY OBECNÉ – AKÚTNY TEST TOXICITY KONTAKTOM

1. METÓDA

Táto metóda akútneho toxikologického testu je totožná s metódou OECD TG 214 (1998).

1.1. ÚVOD

Tento toxikologický test je laboratórna metóda navrhnutá na stanovenie orálnej akútnej toxicity aplikovaných chemických látok pri ochrane dospelých včiel robotníc.

Pri stanovení a vyhodnocovaní toxických charakteristík látok sa určenie akútnej a orálnej toxicity u včiel môže požadovať všade tam, kde je napr. možná expozícia včiel danou chemikáliou. Akútny orálny test toxicity sa vykonáva s cieľom zistenia vrodenej toxicity pesticídov a iných chemikálii voči včelám. Výsledky testu je možné použiť na definovanie potreby na následné vyhodnotenie. Túto metódu je možné použiť najmä v postupných krokových – odborných programoch, zameraných na zistenie nebezpečenstva vplyvu pesticídov na včely, založených na postupnom progrese od laboratórnych testov toxicity cez semipoľné až ku poľným – terénnym pokusom (1). Pesticídy môžu byť testované ako aktívne látky (a. s.) alebo ako viazané produkty.

Toxický štandard sa dá použiť na overenie citlivosti včiel a presnosť testovacieho postupu.

1.2. DEFINÍCIE

Akútna orálna toxicita: sú nepriaznivé účinky, ktoré sa dostavia maximálne do 96 hodín po lokálnej aplikácií jednej dávky testovanej látky.

Dávka: je množstvo skonzumovanej testovanej látky a je vyjadrená ako hmotnosť (μg) testovanej látky na testovaného živočícha (μg/-včelu).

LD_{50} (stredná letálna dávka): je štatisticky odvodená hodnota jednej dávky látky, po ktorej dochádza k úhynu 50 % testovaných živočíchov pri kontakte s látkou. Hodnota LD_{50} je vyjadrená v (μg) testovanej látky na včelu. U pesticídov môže byť testovaná látka aj v aktívnej forme (a. s.), ale aj vo forme viazanej, a to ako produkt obsahujúci viac ako jednu účinnú látku.

Mortalita: úhyn živočícha sa konštatuje v prípade jeho kompletnej imobility.

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Dospelé robotnice včiel obecných *(Apis mellifera)* sú vystavené celému radu dávok testovanej látky, ktorá je rozpustená vo vhodnom nosiči, priamou aplikáciou do thoraxu (kvapôčky). Dĺžka trvania testu je 24 hodín. Potom sa včely kŕmia rovnakou stravou, ktorá neobsahuje testovanú látku. Ak sa úmrtnosť zvýši medzi 24 až 48 hodinami, kým kontrolná úroveň úmrtnosti zostáva na akceptovateľnej hladine, t. j. menej alebo rovných 10 %, je vhodné predĺžiť trvanie testu maximálne na 96 hodín. Výsledky sa analyzujú, aby sa mohla vypočítať hodnota LD_{50} za 24 hodín a 48 hodín a v prípade predĺženia štúdie aj za 72 hodín a 96 hodín.

▼B

1.4. VALIDITA TESTU

Ak má byť test platný, musia platiť nasledovné podmienky:

— priemerná úmrtnosť na celkový počet kontrol nesmie prekročiť 10 % na konci testu,

— hodnota LD_{50} toxického štandardu musí spĺňať špecifikovaný rozsah.

1.5. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.5.1. **Výber včiel**

Mali by sa použiť mladé robotnice rovnakého druhu (t. j. včely rovnakého veku, včely rovnako stravované, atď. Včely by sa mali odobrať z primeraného kŕmeného, zdravého chovu a ak je to možné, z chovu nezasiahnutého chorobami a z kolónie s kráľovnou s overeným pôvodom a fyziologickým stavom. Včely by sa mali vyberať ráno pred použitím alebo večer pred testovacím dňom a potom by sa mali udržiavať v týchto podmienkach až do nasledujúceho dňa. Vhodné sú včely odobrané z rámov, bez mláďat. Malo by sa vyvarovať odoberaniu včiel skoro na jar alebo neskoro na jeseň, keďže v tomto období sa včelám mení ich fyziológia. V prípade, že sa predsa test musí vykonať počas skorej jari alebo neskorej jesene, včely môžu byť v prípade núdze premiestnené do inkubátora a počas jedného týždňa sa budú kŕmiť včelím chlebom (peľ zozbieraný z plástov) a roztokom sacharózy. Včely liečené chemickými látkami ako sú antibiotiká, antivarroa produktmi, atď. by sa nemali použiť na toxikologický test po dobu štyroch týždňov od poslednej liečby.

1.5.2. **Podmienky kŕmenia a chovu včiel**

Vhodné sú úle s ľahkým čistením a dobrým vetraním. Je možné použiť ľubovoľný vhodný materiál, ako je napr.: nehrdzavejúca oceľ, pletivo, plastické alebo drevené úle. Je vhodné umiestniť skupinu 10 včiel do jedného úľa. Veľkosť testovacích úľov by mala byť úmerná počtu včiel, t. j. aby bol zabezpečený dostatočný priestor.

Včely sa majú držať v tme, v miestnosti určenej na pokusy pri teplote 25 ± 2 ºC. Relatívna vlhkosť, normálne okolo 50 – 70 %, by mala byť zaznamenávaná počas doby trvania testu. Manipulovanie vrátane liečby a pozorovania sa môžu uskutočňovať za denného svetla. Ako potrava sa použije roztok sacharózy vo vode s konečnou koncentráciou 500 g/l (50 % objemových). Po podaní testovacích dávok by sa mala strava podávať *ad libitum* s použitím včelieho kŕmidla. Je možné použiť sklenenú trubicu (približne 50 mm dlhú a 10 mm širokú s otvoreným zúženým koncom okolo 2 mm v priemere)

1.5.3. **Príprava včiel**

Zozbierané včely sa znecitlivejú použitím oxidu uhličitého alebo dusíka pri každej aplikácií testovanej látky. Je potrebné minimalizovať nielen množstvo použitého anestetika, ale aj časť expozície. Umierajúce včely je pred začiatkom testu potrebné nahradiť zdravými.

1.5.4. **Príprava dávok**

Testovanú látku je možné aplikovať ako roztok na nosiči, t. j. organické rozpúšťadlo alebo vodný roztok so zvlhčujúcim činidlom. Ako organické rozpúšťadlo sa používa acetón, ale je možné použiť aj iné organické rozpúšťadlá s nízkou toxicitou voči včelám (napr. dimeťnylformamid, dimetylsulfoxid). Pri vo vode rozpustných viazaných produktoch a vysoko polárnych organických zlúčeninách nerozpustných v organických nosičových rozpúšťadlách je lepšie použiť slabé roztoky komerčne dostupných zvlhčujúcich činidiel na ľahšiu aplikáciu (napr. Agral, Cittowet, Lubrol, Triton, Tween).

▼B

Mali by sa pripraviť vhodné kontrolné roztoky, t. j. roztoky, v ktorých rozpúšťadlo alebo disperzné činidlo rozpustí testovanú látku. Použijú sa dve oddelené kontrolné skupiny: jedna s použitím vody a jedna s použitím rozpúšťadla alebo disperzanta.

1.6. POSTUP

1.6.1. **Test a kontrolné skupiny**

Počet dávok a ich opakovaní by mal spĺňať štatistické požiadavky na stanovenie LD_{50} s 95 % pravdepodobnosťou. Bežne sa na tento test požaduje päť dávok v geometrickom rade s faktorom nepresahujúcim 2,2 na daný rozsah LD_{50}. Počet dávok sa musí stanoviť vo vzťahu ku strmosti krivky toxicity (dávka versus úmrtnosť). Je potrebné vziať do úvahy štatistickú metódu, ktorá bola zvolená na analýzu výsledkov. Výber rozsahu pre test umožní vybrať vhodné koncentrácie dávkovanej látky.

Každá testovaná koncentrácia sa podá minimálne trom skupinám, každá po desiatich včelách.

Súčasne by sa mali vykonať testovacie série na aspoň troch kontrolných skupinách, každá po desiatich včelách. V prípade použitia organického rozpúšťadla alebo zvlhčovacieho činidla sa použijú tri dodatočné kontrolné skupiny po desiatich včelách.

1.6.2. **Toxický štandard**

Do testovacích sérií je potrebné zahrnúť toxický štandard. Následne sa vyselektujú aspoň tri dávky, aby sa dosiahla očakávaná hodnota LD_{50}. Pri každej testovanej dávke by sa mali použiť minimálne tri úle, každý po desiatich včelách. Preferovaný štandard toxicity je dimetoát, pre ktorý je zaznamenaná hodnota LD_{50} za 24 hodín v rozmedzí 0,10 – 0,30 µg a. s. /včelu (2). Aj iné štandardy toxicity budú akceptovateľné tam, kde sa dá získať dostatočné množstvo údajov na overenie očakávanej odozvy dávky (napr. parathion).

1.6.3. **Expozícia**

1.6.3.1. *Podávanie dávok*

Je potrebné individuálne zaobchádzať s anestezovanými včelami pri lokálnej aplikácii. Včelám sa náhodne prideľujú testovacie látky a náhodným výberom sa podrobia kontrole. Objem 1 µl roztoku obsahujúceho testovanú látku vo vhodnej koncentrácii sa bude aplikovať mikroaplikátorom na dorzálnu stranu thoraxu každej včely. V prípade opodstatnenosti je možné použiť aj iné objemy roztoku. Po aplikácii testovanej látky sa včely umiestnia do testovacích úľov a vyživujú sa roztokom sacharózy.

1.6.3.2. *Trvanie testu*

Na trvanie testu sa uprednostňuje doba 48 hodín. Ak úmrtnosť včiel prekročí hodnotu 10 % počas prvých 24 hodín až 48 hodín, trvanie testu by malo byť predĺžené na maximálne 96 hodín za predpokladu, že kontrola úmrtnosti neprekročí 10 %.

▼B

1.6.4. **Pozorovania**

Úmrtnosť sa zaznamenáva po 4 hodinách od začiatku testu a potom po 24 hodinách a po 48 hodinách. Ak je potrebný predĺžený čas pozorovania, ďalšie hodnotenie by malo prebehnúť v 24 hodinových intervaloch, avšak maximálne do celkových 96 hodín na dôkaz toho, že úmrtnosť včiel neprekročí stanovených 10 %.

Všetky abnormálne prejavy správania sa včiel počas testovaného obdobia by mali byť zaznamenané.

1.6.5. **Limitný test**

V niektorých prípadoch (napr. za predpokladu, že testovaná látka má nízku toxicitu) je možné vykonať limitný test 100 µg a. s. /včelu s cieľom dokázať, že hodnota LD_{50} je väčšia ako uvedená hodnota. Rovnaký postup by sa mal použiť vrátane troch opakovaní testu na danú testovanú látku aj na relevantnú kontrolu a použitie toxického štandardu. V prípade mortality sa celá štúdia prepracuje. Ak sa spozorujú subletálne účinky (pozri časť 1.6.4.), aj tieto je potrebné zaznamenať.

2. **ÚDAJE A SPRÁVA**

2.1. ÚDAJE

Údaje sa zosumarizujú do tabuľkovej formy, na každú pokusnú skupinu zvlášť, tak isto aj na kontrolnú skupinu včiel a skupinu použitú na zistenie toxického štandardu, na počet použitých včiel, úmrtnosť v každom období pozorovania a na počet včiel so zmeneným správaním. Údaje mortality je potrebné analyzovať vhodnými štatistickými metódami (napr. probitová analýza, pohyblivý priemer, binominálna pravdepodobnosť) (3), (4). Grafické záznamy dávok a ich odoziev by mali byť zaznamenané formou kriviek, a to v každý odporúčaný čas pozorovania (napr. 24 h, 48 h, a ak je to potrebné 72 h, 96 h) na výpočet sklonu – strmosti kriviek a stredných smrteľných dávok (LD_{50}) s 95 % pravdepodobnostnými limitami. Opravy týkajúce sa kontroly úmrtnosti sa vykonajú za pomoci Abbottových korekcií (4), (5). Tam, kde nebola úplne skonzumovaná použitá potrava, zaznamenajú sa skonzumované testovacie dávky na skupinu včiel. Hodnota LD_{50} by mala byť vyjadrená v µg testovanej látky na včelu.

2.2. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí obsahovať nasledujúce informácie:

2.2.1. **Testované látky:**

— fyzikálna podstata a relevantné fyzikálno-chemické vlastnosti (ako napr.: stabilita – odolnosť vo vode, tlak pár),

— identifikačné chemické údaje vrátane štruktúrneho vzorca, čistota (napr. pesticídov, identita a koncentrácia účinnej látky alebo látok).

2.2.2. **Testované druhy:**

— odborný – vedecký názov, druh, približný vek (v týždňoch), metóda zberu, dátum zberu,

— informácie o kolónach použitých na zber testovaných včiel vrátane zdravotného stavu, všetkých chorôb týkajúcich sa dospelého včelstva, všetky preliečenia atď.

▼B

2.2.3. **Podmienky testu**

— teplota a relatívna vlhkosť experimentálnej miestnosti,

— podmienky chovu včiel, vrátane typu, veľkosti a materiálu testovacích úľov,

— metódy podávania testovanej látky, napr. použité rozpúšťadlo – nosič, objem testovaného roztoku, použitý roztok anestetika,

— koncepcia testu, napr.: použitý počet a testovacie koncentrácie, počet kontrol na každú testovanú koncentráciu a kontrolu, počet kópií testovacích úľov a počet včiel na testovaný úľ,

— dátum testu.

2.2.4. **Výsledky:**

— výsledky predbežného výberu rozsahu štúdie, ak bol výber uskutočnený,

— nespracované údaje: úmrtnosť pri každej testovanej dávke pri každom pozorovanom čase,

— graf udávajúci závislosť dávky – odozvy na konci každého testu,

— hodnoty LD_{50} s 95 % pravdepodobnosťou limitu na každý odporúčaný čas pozorovania, na testovanú látku a toxický štandard,

— štatistické postupy použité na určenie LD_{50},

— úmrtnosť pri kontrolách,

— iné biologické dopady pozorované alebo merané, ako napr.: abnormálne správanie sa včiel (vrátane odmietnutia testovacej dávky potravy), pomer skonzumovanej potravy v skupinách včiel testovaných a netestovaných,

— akékoľvek odchýlky od testovacích postupov tu uvedených a všetky dostupné, relevantné informácie.

3. **POUŽITÁ LITERATÚRA**

(1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision – Making Scheme for the Enviromental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO Bulletin, Vol.23, N.1, s. 151 – 165. March 1993.

(2) Gough, H.J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B.(1994). The use of dimethoat as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981 – 1992. Journal of Apicultural Research, 22, s. 119 – 125.

(3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method ef evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol, and Exper. Ther., s. 99 – 113.

(4) Finney, D.J. (1971. Probit analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.

(5) Abbott, W.S.(1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol, 18, s. 265 – 267.

▼B

C. 18. **ADSORPCIA ALEBO DESORPCIA S POUŽITÍM ROVNOVÁŽNEJ METÓDY DÁVKOVANIA**

1. **METÓDA**

Táto metóda je totožná s metódou OECD TG 106, na stanovenie adsorbcie alebo desorbcie v zemine, použitím dávkovacej rovnovážnej metódy (2000).

1.1. ÚVOD

Metóda sa zaoberá kruhovým testom a praktickým postupom určeným na selekciu pôdy na vývoj adsorbčného testu (1), (2), (3), (4) a tiež jeho zavedením na vnútroštátnej úrovni (5), (6) (7), (8), (9), (10), (11).

Adsorbčné alebo desorbčné štúdie sú užitočné na získavanie základných informácií o pohybe chemikálií a ich distribúcii v pôde, vode a v plynnom stave biosféry (12), (13), (14), (15), (16), (17), (18), (19), (20), (21). Tieto informácie môžu byť použité pri predvídaní alebo odhade, napríklad možnej dosažiteľnej miery degradácie chemikálie (22), (23), transformácii a po príjme organizmom (24), lúhovaním cez pôdny profil (16), (18), (19), (21), (25), (26), (27), (28), prchavosťou pôdy (21), (29), (30), prenosom z povrchu terénu do prírodných vodných zdrojov (18) (31), (32). Údaje o adsorbcii môžu byť použité na porovnávacie a modelové účely (19), (33), (34), (35).

Distribúcia chemikálii medzi pôdou a vodnými fázami je komplexný proces, ktorý závisí od počtu rozdielnych faktorov: chemickej povahy látky (12), (36), (37), (38), (39), (40), charakteristík pôdy (4), (12), (13), (14), (41), (42), (43), (44), (45), (46), (47), (48), (49) a klimatických faktorov ako sú napríklad zrážky, teplota, slnečný svit a vietor. Preto predkladaným zjednodušeným laboratórnym modelom ako je táto metóda, nemôžu byť kompletne postihnuté všetky rôznorodé fenomény a mechanizmy zahrnuté v procese adsorbcie chemikálie pôdou. Akokoľvek, aj keď sa týmto modelom nedajú pokryť všetky enviromentálne možné prípady, môže poskytnúť hodnotné informácie o význame adsorbcie chemikálií na životné prostredie.

Pozri Všeobecný úvod.

1.2. ÚČEL

Cieľom tejto metódy je stanovenie adsorbčného alebo desorbčného správania sa látok v pôde. Cieľom je získať údaje o sorpčných hodnotách, ktoré môžu byť použité na predpoklad segmentácie spomedzi množstva enviromentálnych podmienok: rovnovážnych adsorbčných koeficientov pre chemikálie na rôznych pôdach, ktoré sú vymedzené funkciou pôdnych charakteristík (ako napr.: obsah organického uhlíka, obsah ílov, pôdnou štruktúrou a pH). Použijú sa rôzne pôdne typy, aby sa čo najširšie pokryl rozsah interakcií danej látky s prírodnými typmi pôd.

V tejto metóde adsorbcia reprezentuje proces väzby chemikálie na pôdny povrch: nerozlišuje medzi rozdielnymi adsorbčnými procesmi (fyzikálnou alebo chemickou adsorbciou) a procesmi ako povrchovo katalyzovaná degradácia, rozsahom adsorbcie alebo chemickou reakciou. Adsorbcia, ktorá bude prebiehať na koloidných časticiach (o priemere 0,2 um) vytvorených pôdou, nie je bratá do úvahy.

▼B

Pôdne parametre, ktoré sú braté do úvahy z pohľadu adsorpcie a najväčšej miery dôležitosti, sú: obsah organického uhlíka (3), (4), (12), (13), (14), (41), (43), (44), (45), (46), (47), (48); obsah ílu a pôdna štruktúra (3), (4), (41), (42), (43), (44), (45), (46), (47), (48) a pH pre ionizovateľné zlúčeniny (3), (4), (42). Ďalšie pôdne parametre, ktoré môžu mať dopad na adsorpciu alebo desorpciu danej látky, sú efektívne katióny s výmennou kapacitou (ECEC), obsah amorfného železa a oxidov hliníka, hlavne na vulkanické a tropické pôdy (4), tak ako aj na špecifický povrch (49).

Test je navrhnutý na vyhodnocovanie adsorpcie chemikálií na rozdielnych pôdnych typoch s rôznymi rozsahmi obsahu organického uhlíka, obsahu ílu, pôdnej matrice a hodnoty pH pôdy. Tento test zahrňuje tri rady:

Rad 1: — pomer pôda/roztok,

— čas potrebný na dosiahnutie adsorpčnej rovnováhy a množstvo testovanej látky adsorbovanej v rovnovážnom stave,

— adsorpcia testovanej látky na povrchoch testovaných nádob a stabilita testovanej látky počas trvania testu.

Rad 2: Skríningový test: Adsorpcia je študovaná na piatich rozdielnych pôdnych typoch v zmysle adsopčnej kinetiky pri jednotnej koncentrácii a stanovenie distribučných koeficientov K_d a K_{oc}.

Rad 3: Stanovenie Freundlichových adsorpčnych izoterm na vymedzenie vplyvu koncentrácie na rozšírenie pôdnej adsorpcie.

Štúdia desorpcie vo význame desorpčnej kinetiky/-Freundlichových desorpčných izoterm (dodatok 1).

1.3. DEFINÍCIE A JEDNOTKY

Symbol	Definície	Jednotky
A_{t_i}	adsorpčné percento v čase t_i	%
A_{eq}	adsorpčné percento v adsorpčnej rovnováhe	%
$m_s^{ads}(t_i)$	hmotnosť testovanej latky adsorbovanej na pôdu v čase t_i	µg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	hmotnosť testovanej látky adsorbovanej na pôdu počas časového intervalu Δt_i	µg
$m_s^{ads}(eq)$	hmotnosť testovanej látky adsorbovanej na pôdu v adsorpčnej rovnováhe	µg
m_0	hmotnosť testovanej látky v testovacej trubici na začiatku adsorpčného testu	µg
$m_m^{ads}(t_i)$	hmotnosť podielu testovanej látky meranej pomere ($v_a{}^A$) v časovom bode t_i	µg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	hmotnosť látky v roztoku v adsorbčnej rovnováhe	µg
$m_{pôda}$	množstvo pôdnej fázy vyjadrenej ako vysušená hmota pôdy	g

▼B

Symbol	Definície	Jednotky
C_{st}	hmotnostná koncentrácia zásobného roztoku látky	ug cm^{-3}
C_0	počiatočná hmotnostná koncentrácia testovaného roztoku v kontakte s pôdou	µg cm^{-3}
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	hmotnostná koncentrácia látky vo vodnej fáze v čase t_i, v ktorom je analýza uskutočnená	µg cm^{-3}
$C_s^{ads}(eq)$	obsah adsorbovanej látky na pôde v adsorpčnej rovnováhe	µg g^{-1}
$C_{aq}^{ads}(eq)$	hmotnostná koncentrácia látky vo vodnej fáze v adsorpčnej rovnováhe	µg cm^{-3}
V_0	počiatočný objem vodnej fázy v kontakte s pôdou počas adsorpčného testu	cm^3
v_a^A	objem podielu, v ktorom je meraná testovaná látka	cm^3
K_d	distribučný adsorbčný koeficient	cm^3 g^{-1}
K_{oc}	organický uhlík normalizujúci adsorpčný koeficient	cm^3 g^{-1}
K_{om}	organická hmota normalizujúca distribučný koeficient	cm^3 g^{-1}
K_F^{ads}	Freundlichov adsorpčný koeficient	$\mu g^{1-1/n}$ $(cm^3)^{1/n}$ g^{-1}
1/n	Freundlichov exponent	
D_{t_i}	desorpčné percento v časovom bode t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	desorpčné percento korešpondujúce s časovým intervalom Δt_i	%
K_{des}	aparentný desorpčný koeficient	cm^3 g^{-1}
K_F^{des}	Freundlichov desorpčný koeficient	$\mu g^{1-1/n}$ $(cm^3)^{1/n}$ g^{-1}
$m_{aq}^{des}(t_i)$	hmotnosť testovanej látky desorbovanej z pôdy v čase t_i	µg
$m_m^{des}(\Delta t_i)$	hmotnosť testovanej látky desorbovanej z pôdy počas času Δt_i	µg
$m_m^{des}(eq)$	hmotnosť látky určenej analyticky vo vodnej fáze v desorpčnej rovnováhe	µg
$m_{aq}^{des}(eq)$	celková hmotnosť testovanej látky desorbovanej v desorpčnej rovnováhe	µg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	hmotnosť zostávajúcej látky adsorbovanej na pôdu po časovom intervale Δt_i	µg
m_{aq}^A	hmotnosť látky po adsorpčnej rovnováhe pri nekompletnej objemovej zámene	µg
$C_s^{des}(eq)$	obsah zostatkovej testovanej látky adsorbovanej na pôdu v desorpčnom eguilibriu	µg g^{-1}

▼B

Symbol	Definície	Jednotky
$C_{aq}^{des}(eq)$	hmotnostná koncentrácia testovanej látky vo vodnej fáze v desorpčnej rovnováhe	µg cm^{-3}
V_T	celkový objem vodnej fázy v kontakte s pôdou počas desorpčného kinetického experimentu počas sériovej metódy	cm^3
V_R	objem supernatantu odstráneného z trubice po dosiahnutí adsorpčnej rovnováhy a nahradenej rovnakým objemom roztoku 0,01 M $CaCl_2$	cm^3
v_a^D	objem alikvotného podielu dávkovanej látky na analytické účely v čase (i), počas experimentu desorpčnej kinetiky uskutočneného sériovou metódou	cm^3
$V_{ra}i^D$	objem roztoku odobratého z trubice (i) na meranie testovanej látky v experimente desorpčnej kinetiky (paralelná metóda)	cm^3
V_r^F	objem roztoku odobratého z trubice na meranie testovanej látky v desorpčnej rovnováhe	cm^3
MB	hmotnostná rovnováha	%
m_E	celkové množstvo testovanej látky extrahovanej z pôdy a stien testovacích nádob v dvoch krokoch	µg
V_{rec}	objem supernatantu získaného po adsorpčnej rovnováhe	cm^3
P_{ow}	oktanol/parciálny vodný koeficient	
pKa	disociačná konštanta	
S_w	rozpustnosť vo vode	g l^{-1}

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Známe objemy roztokov testovanej látky, neoznačenej alebo radioaktívne označenej so známymi koncentráciami v 0,01 M roztoku $CaCl_2$ sú pridané do vzoriek pôdy o známej hmotnosti v suchom stave, ktoré sú preekvilibrované s 0,01 M roztokom $CaCl_2$. Zmes sa premiešava dostatočne dlhý čas. Pôdne suspenzie sú potom oddelené odstredením a ak je potrebné filtráciou a analyzuje sa vodná fáza. Množstvo testovanej látky adsorbovanej na pôdnej vzorke je vypočítané ako rozdiel medzi množstvom testovanej látky obsiahnutej v roztoku na začiatku a zostatkového množstva látky na konci experimentu (nepriama metóda).

Variabilne je možné stanovovať množstvo adsorbovanej testovanej látky priamo analýzou pôdy (priama metóda). Tento postup, ktorý zahŕňa postupný program pôdnej extrakcie s vhodným rozpúšťadlom, sa odporúča v prípadoch, kde rozdiel koncentrácií roztoku látky nemôže byť presne určený. Príklady takýchto prípadov sú: adsorpcia testovanej látky na povrchu testovaných nádob, nestabilita testovanej látky v dobe trvania experimentu, nízka adsorpcia spôsobujúca iba malú zmenu koncentrácie v roztoku a silná adsorpcia poskytujúca nízku koncentráciu, ktorá nemôže byť presne stanovená. Ak sa používa radioaktívne označená látka, pôdna extrakcia môže byť nahradená analýzou pôdnej fázy po zhorení a tekutým scintilačným načítavaním. Nakoľko tekuté scintilačné načítavanie je nešpecifická technika, ktorá nemôže rozlišovať medzi pôvodnými a transformovanými produktmi, mala by byť použitá iba v prípade, ak je testovaná chemikália stabilná počas trvania štúdií.

▼B

1.5. INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

Chemické reagenty by mali mať stupeň čistoty – analyticky čistá. Odporúča sa použitie neoznačkovaných testovacích látok so známym zložením aspoň 95 % čistoty alebo u rádiooznačených látok o známom zložení a rádio-čistoty v prípade krátkej polovičnej doby rozpadu by sa mali aplikovať korekcie na rozpad.

Pred začatím adsorpčne desorpčného testu by mali byť dostupné nasledovné informácie o testovanej látke:

a) rozpustnosť vo vode (A.6);

b) tlak pár (A.4) a/alebo Henryho konštanta;

c) abiotická degradácia: hydrolýza ako funkcia pH (C.7);

d) rozdeľovací koeficient (A.8);

e) stav biodegradability (C.4) alebo aeróbna a anaeróbna transformácia v pôde;

f) pKa ionizovateľných látok;

g) priama fotolýza vo vode (napr.: UV-Vis absorpčné spektrum vo vode, množstvo výťažku) a fotodegradácia na pôde.

1.6. APLIKOVATEĽNOSŤ TESTU

Tento test sa dá aplikovať na chemické látky, pre ktoré je možné aplikovať analytickú metódu s dostatočnou presnosťou. Dôležitým parametrom, ktorý môže ovplyvniť dôveryhodnosť výsledkov, špeciálne v prípadoch, kedy sa používa nepriama metóda, je stabilita testovanej látky v závislosti na čase počas trvania testu. T. j. predpokladá sa skontrolovať stabilitu a úvodnú štúdiu; ak sa spozoruje transformácia v závislosti na čase, odporúča sa, aby hlavná časť testu bola uskutočnená v oboch fázach, kvapalnej aj pevnej.

Pri realizovaní tohto testu sa môžu objaviť ťažkosti u testovaných látok s nízkou rozpustnosťou vo vode ($S_w < 10^{-4}$ g l^{-1}), ako aj u veľmi nabitých látok, vzhľadom na skutočnosť, že koncentrácia v kvapalnej fáze sa nemôže merať analyticky s dostatočnou presnosťou. V takýchto prípadoch musia byť urobené dodatočné opatrenia. Návod, ako postupovať v týchto prípadoch (ako zvládnuť tieto problémy), je uvedený v zodpovedajúcej časti tejto analytickej metódy.

Pri použití prchavých látok by sa malo vyvarovať stratám počas štúdie.

1.7. OPIS METÓDY

1.7.1. **Prístroje a chemikálie**

Štandardné laboratórne vybavenie:

a) Trubice a nádobky na vykonanie experimentu. Je dôležité, aby tieto trubice a nádobky:

— zapadali do aparatúry odstredivky, aby minimalizovali manipuláciu a prenos chýb,

— boli vyrobené z nerezového materiálu, ktorý minimalizuje adsorpciu testovanej látky na ich povrchu

▼B

b) Miešacie zariadenie: trepačka alebo ekvivalentné zariadenie na trepanie, ktoré je schopné zachovať pôdu počas doby pretrepávania v stave suspenzie.

c) Odstredivka: uprednostňuje sa vysokorýchlostná, napr.: so silou odstredenia väčšou ako 3 000 g, tepelne regulovateľnou, so schopnosťou odstrániť častice s priemerom väčším ako 0,2 μm z vodného roztoku. Kontajnery by mali byť počas pretrepávania a odstreďovania uzavreté kvôli strate vody a prchavosti látok, kvôli minimalizácii adsorpcií na látky by sa mali používať deaktivované uzávery ako napr. teflónom pokryté skrutkové vrchnáčiky.

d) Voliteľné: je možné použiť aj filtračné zariadenie, filtre s porozitou 0,2 μm, sterilné, na jednorázové použitie. Špeciálna starostlivosť sa musí venovať výberu materiálu filtra kvôli zamedzeniu strát testovanej látky na jeho povrchu; pri málo rozpustných testovaných látok sa neodporúča filter z organického materiálu.

e) Analytické prístroje, vhodné na meranie koncentrácie testovaných chemikálií.

f) Laboratórna pec, schopná udržať teplotu v rozsahu 103 °C až 110 °C.

1.7.2. **Charakteristika a výber pôdy**

Pôda by mala byť charakterizovaná tromi parametrami, ktoré sú zodpovedné za ich adsorpčnú kapacitu: organický uhlík, obsah hliny a štruktúra pôdy a pH. Ako už bolo spomenuté (pozri Prehľad), ostatné fyzikálno-chemické vlastnosti pôdy môžu ovplyvňovať adsorpciu alebo desorpciu špeciálnych látok a mohli by zavážiť v takýchto prípadoch.

Metódy, ktoré charakterizujú pôdu, sú veľmi dôležité a môžu mať signifikantný vplyv na výsledky. Preto sa odporúča, aby pH pôdy bolo merané v roztoku 0,01 M $CaCL_2$ (to je roztok, ktorý sa používa pri testoch (desorpcia alebo adsorpcia) podľa odpovedajúcej ISO-10390-1. Tiež sa odporúča, aby sa ostatné relevantné vlastnosti pôdy stanovovali v súlade so štandardným postupom (napr. ISO „Príručka pre analýzu pôdy“). Toto zabezpečí analýzy sorpčných údajov na báze všeobecne štandardizovaných parametrov na pôdu. Niektoré návody, opisy existujúcich štandardných metód na analýzu a charakterizáciu pôdy je možné získať v odkazoch (50 – 52). Na kalibráciu testovacích metód na pôdu sa odporúča použiť referenčné pôdy.

Návod (sprievodca) na výber pôd na adsorpčno alebo desorpčné experimenty je uvedený v tabuľke 1. Sedem vybratých typov pôd nachádzajúcich sa v miernom geografickom pásme. Pre ionizujúce sa testovacie látky by vybraté pôdy mohli zahŕňať široké rozpätie pH, v prípade, že by mohli zhodnotiť adsorpciu látky v jej ionizujúcej a neionizujúcej forme. Návod, prehľad, na koľkých mnohých rozdielnych typoch pôd sa používa v rozličných stupňoch testuje uvedený v odseku 1.9. – Vykonanie testu.

Ak sa uprednostňujú iné typy pôdy, tieto môžu byť charakterizované tými istými parametrami a môžu mať podobné odchýlky alebo variácie vo vlastnostiach tak, ako je to uvedené v tabuľke 1, hoci nedosahujú presne uvedené kritériá.

▼B

Tabuľka 1

Návod na výber vzoriek pôdy pre adsorpciu/desorpciu

Druh pôdy	Rozsah pH (v 0,01 M $CaCl_2$)	Obsah organického uhlíka (%)	Obsah ílu (%)	Matrica pôdy ([1])
1	4,5 - 5,5	1,0 - 2,0	65 – 80	íl
2	> 7,5	3,5 - 5,0	20 – 40	ílovitá hlina
3	5,5 - 7,0	1,5 - 3,0	15 – 25	prachovitá hlina
4	4,0 - 5,5	3,0 - 4,0	15 – 30	hlina
5	< 4,0 - 6,0 ([2])	<0,5 - 1,5 ([2]) ([3])	< 10 – 15 ([2])	hlinitý piesok
6	> 7,0	<0,5 - 1,0 ([2]) ([3])	40 – 65	ílovitá hlina/íl
7	< 4,5	> 10	< 10	piesok/hlinitý piesok

([1]) Podľa FAO a US systému (85).
([2]) Príslušné premenné by mali mať hodnoty v uvedenom rozsahu. Ak sa pri hľadaní vhodnej matrice pôdy vyskytnú ťažkosti, v takomto prípade sa môžu akceptovať aj hodnoty nižšie ako uvedené minimum.
([3]) Pôdy s obsahom organického uhlíka nižším ako 0,3 % môžu pôsobiť rušivo na korelačný vzťah medzi obsahom organického uhlíka a adsorpciou. Takže sa odporúča používať pôdy s minimálnym obsahom organického uhlíka 0,3 %.

1.7.3. **Výber a skladovanie pôdnych vzoriek**

1.7.3.1 *Výber*

Neodporúčajú sa žiadne špecifické vzorkovacie techniky: vzorkovacie techniky závisia od účelu štúdie (53), (54), (55), (56), (57), (58).

Je možné uvažovať o nasledujúcich možnostiach:

a) podrobné informácie o histórii miesta poľa sú nevyhnutné; táto zahrňuje umiestnenie, vegetačný povrch, aplikáciu prípravkov na ochranu rastlín, priemyselných hnojív, biologických prípravkov alebo náhodnú kontamináciu. Odporúčania štandardu ISO o vzorkovaní pôd (ISO 10381-6) by sa mali dodržiavať s ohľadom na opis vzorkovacieho miesta.

b) vzorkovacie miesto musí byť definované podľa UTM (Universal Transversal Mercator – Projection/European Horizontal Datum) alebo geografickými súradnicami, čo môže povoliť v budúcnosti opätovné zhromažďovanie špeciálnych pôd alebo by mohlo pomôcť definovať pôdu z rôzne/rozdielne klasifikovaných systémov používaných v rozličných krajinách. Tiež iba A horizont by mohol byť zhromaždený do hĺbky 20 cm. Špeciálne pre druh pôdy č. 7, ak je prítomný O_h horizont ako časť pôdy, môže byť zaradený do vzorkovania.

Vzorky pôdy by mohli byť transportované pri použití kontajnerov za teplotných podmienok, ktoré garantujú, že počiatočné vlastnosti pôdy nie sú podstatne zmenené.

▼B

1.7.3.2. *Skladovanie*

Uprednostňuje sa používať čerstvo odobratú pôdu. Iba v prípade, keď to nie je možné, pôda sa môže uskladniť pri teplote miestnosti a mala by byť sušená na vzduchu. Nie je určený limit na uskladňovanie, ale pôda, ktorá bola uskladnená dlhšie než tri roky, by mala byť reanalyzovaná pred použitím na obsah organického uhlíka, pH a CEC.

1.7.3.3. *Manipulácia a príprava pôdnych vzoriek na test.*

Pôda sa suší vzduchom pri izbovej teplote (preferuje sa teplota medzi 20 °C – 25 °C). Desagregácia by sa mala dať vykonať s minimálnou silou tak, aby sa originálna štruktúra pôdy zmenila na najmenšiu možnú. Pôda sa preosieva na čiastočky s veľkosťou rovnou alebo menšou ako 2 mm. Mali by sa dodržiavať odporúčania štandardu ISO na vzorkovanie pôdy (ISO 10381-6) s ohľadom na sitovací proces. Odporúča sa vykonať opatrne homogenizáciu vzorky, toto prispeje k vylepšeniu reprodukovateľnosti výsledkov. Obsah vlhkosti každej pôdy sa stanoví na trikrát pri zahriatí na 105 °C až do dosiahnutia konštantnej hmotnosti (približne 12 hodín). Vo všetkých výpočtoch hmotnosť pôdy sa vzťahuje na vysušenú hmotnosť v peci, hmotnosť pôdy upravená o obsah vlhkosti.

1.7.4. **Príprava testovacej látky na aplikáciu na pôdu**

Testovaná látka sa rozpustí v roztoku 0,01 M $CaCL_2$ v destilovanej alebo deionizovanej vode; roztok $CaCL_2$ sa používa ako vodná rozpustná fáza na zlepšenie odstreďovania a minimalizácie výmeny katiónov. Koncentrácia zásobného roztoku by mala byť tri rady vyššia než detekčný limit používanej analytickej metódy. Táto prahová hodnota ochraňuje presnosť stanovenia s ohľadom na metodológiu uvedenú v tejto metóde. Naviac koncentrácia zásobného roztoku by mala byť pod rozpustnosťou testovanej látky vo vode.

Zásobný roztok by mal byť pripravený tesne pred aplikáciou na pôdne vzorky a mal by sa udržiavať v tme pri 4 °C. Čas uskladovania je závislý od stability testovanej látky a jej koncentrácie v roztoku.

Iba pre zle rozpustné látky ($S_w < 10^{-4}$ gl^{-1}), bude potrebné vhodné rozpustné činidlo, ak je ťažko rozpustná v testovanej látke. Takéto rozpúšťajúce činidlo a) by malo byť miešateľné s vodou tak ako je metanol alebo acetonitril; b) jeho koncentrácia by nemala presiahnuť 1 % z celkového objemu zásobného roztoku a mal by predstavovať menej objemu ako je v roztoku testovanej látky, ktorá prichádza do kontaktu s pôdou (pokiaľ možno menej než 0,1 %); a c) nemalo by to byť povrchovo aktívne činidlo alebo by sa nemalo podrobiť solvolytickej reakcii s testovanou chemikáliou. Použitie rozpúšťajúceho činidla sa stanoví a potvrdí výpisom údajov.

Iná alternatíva pri zle rozpustných látkach je pridať označkovanú testovanú látku do testovacieho systému. Testovacia látka je rozpustná v organických rozpúšťadlách; jej alikvotná časť sa pridá do pôdneho systému a 0,01 M $CaCl_2$ v destilovanej alebo deionizovanej vode. Obsah organického rozpúšťadla vo vodnej fáze by sa mal udržiavať tak nízko, ako je to len možné, normálne by nemal presiahnuť 0,1 %. Značkovanie organickým roztokom môže predchádzať nereprodukovateľnosti objemu. Takto môžeme zaviesť ďalšiu následnú chybu v prípade, ak koncentrácie testovanej látky ako rozpúšťadla by neboli rovnaké počas trvania celého testu.

▼B

1.8. ZÁKLADNÉ POŽIADAVKY NA VYKONANIE ADSORPCNEHO ALEBO DESORPČNÉHO TESTU

1.8.1. **Analytická metóda**

Kľúčové parametre, ktoré môžu ovplyvniť presnosť sorbčných meraní, zahŕňajú presnosť analytickej metódy použitej pri rozbore roztoku a adsorbovanej fázy, stabilitu a čistotu testovanej látky, dosiahnutie sorbčnej rovnováhy, veľkosť koncentračnej zmeny roztoku, pomer pôda a roztok a zmeny v pôdnej štruktúre počas ekvilibračného procesu (35), (59 – 62). Niektoré spôsoby chovania sa pri presných východoch sú uvedené v dodatku 2.

Spoľahlivosť použitých analytických metód sa musí skontrolovať v koncentračnom rozsahu, ktorý sa môže vyskytnúť počas testu. Experimentátor by mal mať voľnú ruku pri vyvíjaní vhodnej metódy s náležitou presnosťou, precíznosťou, reprodukovateľnosťou, detekciou limitov a výťažnosťou. Návod, ako vykonať takýto test, je uvedený v nižšie opísanom experimente.

Pôda s vysokou adsorbilitou o hmotnosti cca 20 g s vysokým obsahom organického uhlíka a obsahom ílu sa pretrepáva vo vhodnom objeme 0,01 M $CaCl_2$, napr. 100 cm^3 počas 4 hodín. Tieto udané objemy a váhy môžu kolísať v závislosti na analytických potrebách, ale pomer pôda k roztoku 1:5 je vhodné použiť ako východiskový bod. Zmes sa odstredí a vodná fáza prefiltruje. Určitý objem testovanej látky zásobného roztoku je pridaný do novšieho na dosiahnutie nominálnej koncentrácie vrátane koncentračného rozsahu, ktoré sa môžu vyskytnúť počas testu. Tento objem by nemal prekročiť 10 % konečného objemu vodnej fázy, v záujme zmeniť charakter pred dosiahnutím rovnováhy roztoku tak málo ako sa len dá. Roztok sa následne analyzuje.

Jeden slepý pokus pozostávajúci zo systému pôda + roztok $CaCl_2$, (bez testovanej látky) musí byť zahrnutý do testu z dôvodu na odhalenie artefaktov v analytickej metóde a na efekty matrice zapríčinené pôdou.

Medzi analytické metódy, ktoré môžme použiť na sorpčné merania, patria chromatografia plyn – kvapalina (GLC), vysoko účinná kvapalinová chromaografia (HPLC), spektrometria (GC/hmotnostná spektrometria – plynová chromatografia v kombinácii s hmotnostnou spektrometriou), HPLC/hmotnostná spektrometria – kvapalinová chromatografia v kombinácii s hmotnostnou spektrometriou) a kvapalné scintilačné počítadlo (na látky označené rádioaktívnou látkou). Nezávislosť použitých analytických metód je viazaná na výťažnosť, ktorá by mala byť medzi 90 % – 110 % nominálnej hodnoty.

Charakteristiky a detekcia limitov analytickej metódy vhodnej na vykonanie adsorbčnej štúdie zohrávajú dôležitú úlohu v zadefinovaní testovacích podmienok a celého experimentálneho uskutočnenia testu. Táto metóda kopíruje všeobecnú experimentálnu cestu a poskytuje odporúčania a návod na alternatívne riešenia, kde môžu analytické metódy a laboratórne vybavenie obmedzovať vykonávanie testov.

▼B

1.8.2. **Výber optimálnych pomerov pôda k roztoku**

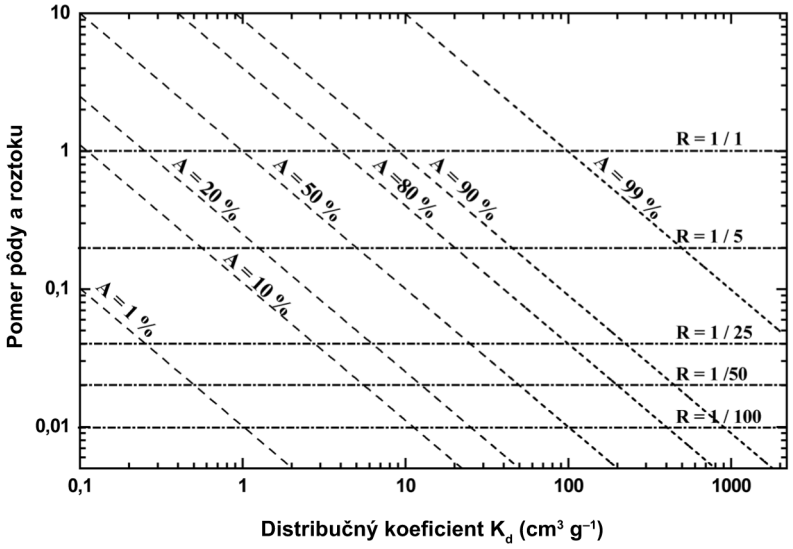
Selekcia vhodného pomeru pôdy k roztoku na sorpčné štúdie záleží na distribučnom koeficiente K_d a relatívnom stupni požadovanej adsorpcie. Zmena koncentrácie látky v roztoku určuje štatistická presnosť meraní založených na tvare adsorpčnej rovnice a limity analytickej metodológie, pri detekcii koncentrácie chemikálie v roztoku. Vo všeobecnosti je užitočné zadať niekoľko pevných pomerov, pre ktoré je adsorpčné percento nad 20 % a vhodnejšie je viac ako 50 % (62), počas ktorej by sa mala zameriavať pozornosť na koncentráciu testovanej látky vo vodnej fáze dostatočne vysokej na to, aby bolo možné vykonať presné meranie. Toto je obzvlášť dôležité v prípade vysokých adsorpčných percent.

Vhodný prístup pri výbere primeraného pomeru pôda/voda je založený na odhade hodnoty K_d, buď z predbežných štúdií alebo sú stanovené bežnými technikami (dodatok 3). Výber vhodného pomeru sa uskutoční na základe záznamu vhodného pomeru pôdy a roztoku verzus hodnota K_d pre fixne stanovené adsorpčné percentá (obr. 1). V tomto zámere je predpoklad, že adsorpčná rovnováha je v lineárnom vzťahu ([1]). Aplikačný vzťah sa dosiahne zmenou usporiadania rovnice (4) pre hodnoty Kd vo forme vzťahu (1):

$$\frac{V_0}{m_{soil}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{ads}(eq)} - 1 \right) K_d \qquad (1)$$

alebo v logaritmickej forme, ktorá predpokladá, že: $R = m_{pôda}/V_0$ a $A_{eq}\ \%/100 = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0}$

$$\log R = -\log K_d + \log \left[\frac{(A_{eq}\%/100)}{(1 - A_{eq}\%/100)} \right] \qquad (2)$$



Obr. 1. Vzťah medzi pomerom pôdy a roztoku a hodnoty K_d v rôznych adsorpčných percentách testovanej látky

([1]) $C_s^{ads}(eq) = K_d \cdot C_{aq}^{ads}(eq)$.

▼B

Obr. 1 ukazuje pomery pôdy a roztoku požadované ako funkcia K_d na rôzne hladiny adsorpcie. Napríklad v pomere pôda k roztoku v hodnote 1:5 a hodnoty K_d rovných 20, by mala nastať približne 80 % adsorpcia. Na získanie 50 % adsorpcie na tú istú hodnotu K_d musí byť použitý pomer 1:25. Tento je možné dosiahnuť vhodným pomerom pôdy a roztoku, ktorý umožňuje výskumníkovi pružnosť vo výbere experimentálnych potrieb.

Oblasti, ktoré sú problematickejšie, súvisia s tým, že niektoré chemikálie sú výrazne alebo len veľmi mierne adsorbované. Pri nízkej adsorpcii sa odporúča pomer 1:1, hoci na niektoré silne organické pôdne typy sú potrebné nižšie pomery na dosiahnutie ílovitej kaše. Dôraz sa kladie na analytickú metodológiu merania malých zmien koncentrácií roztoku, v opačnom prípade budú adsorpčné merania nepresné. Na druhej strane pri veľmi vysokých distribučných koeficientoch, K_d koeficient môže ísť až do pomeru pôdy a roztoku 1:100, kedy zanecháva signifikantné množstva chemikálie v roztoku. Pozornosť treba venovať dokonalému zmiešaniu a systému treba ponechať dostatočný čas na ekvilibráciu. V týchto extrémnych prípadoch, kde chýba primeraná analytická metodológia, je predpoklad hodnoty K_d založený na technike odhadu, napríklad na hodnotách P_{ow} (dodatok 3). Táto metóda môže byť užitočná najmä v prípadoch nízkej adsorbovateľnosti polárnych zlúčenín s hodnotou P_{ow} nižšou ako 20 a pre lipofilné – vysoko sorpčné chemikálie s hodnotou P_{ow} väčšou ako 10^4.

1.9. USKUTOČNENIE TESTU

1.9.1. **Podmienky testu**

Všetky experimenty sa realizujú pri izbovej teplote, ak je to možné, pri konštantnej teplote medzi 20 °C až 25 °C.

Podmienky odstreďovania musia umožňovať odstránenie čiastočiek väčších ako 0,2 μm z roztoku. Táto hodnota uvoľňuje najmenšie častice, ktoré sa považujú za pevné a je hranicou medzi pevnými a koloidnými časticami. Opis priebehu podmienok odstreďovania je uvedený v dodatku 4.

Ak odstreďovacie zariadenia nemôžu garantovať odstránenie častíc väčších ako 0,2 μm, musí sa použiť kombinácia odstredenia a filtrácie s pórovitosťou filtrov 0,2 μm. Tieto filtre by mali byť vyrobené z vhodného inertného materiálu, ktorý zabráni stratám testovanej látky na ich povrchu. V každom prípade je nutné dokázať, že počas filtrovania nedochádza k žiadnym stratám testovanej látky.

1.9.2. **Rad 1 – Úvodná štúdia**

Účel vypracovania úvodnej štúdie bol už uvedený v časti Scope (Prehľad). Návod na vymedzenie takéhoto testu je opísaný s odporučeniami na experiment, uvedenými nižšie.

1.9.2.1. *Výber optimálnych pomerov pôdy k roztoku*

Použijú sa dva pôdne typy a tri pomery pôdy k roztoku (6 experimentov). Jeden z pôdnych typov má vysoký obsah uhlíka a nízky obsah ílu, druhý má nízky obsah organického uhlíka a vysoký obsah ílu. Navrhujú sa nasledovné pomery pôdy k roztoku:

— 50 g pôdy a 50 cm^3 testovanej látky vo vodnom roztoku (pomer 1:1),

▼B

— 10 g pôdy a 50 cm^3 testovanej látky vo vodnom roztoku (pomer 1:5),

— 2 g pôdy a 50 cm^3 testovanej látky vo vodnom roztoku (pomer 1:25).

Minimálne množstvo pôdy, na ktorom sa môže uskutočniť experiment, závisí na laboratórnom vybavení a od účinnosti použitých analytických metód. Odporúča sa použiť aspoň 1 g, prípadne 2 g, ak sa chcú dosiahnuť presné výsledky testu.

Jedna kontrolná vzorka iba s testovanou látkou v roztoku 0,01 M $CaCl_2$ (bez pôdy) sa podrobí presne tomu istému postupu, aký bol použitý na test, s cieľom preskúmania stability testovanej látky v roztoku $CaCl_2$ a jej možnej adsorpcie na povrchoch testovacích nádob.

Čistá vzorka alebo slepý pokus s rovnakým množstvom pôdy o celkovom objeme 50 cm^3 0,01 M roztoku $CaCl_2$ (bez testovanej látky) sa podrobí tomu istému postupu, ako je predpísaný na test. Slúži ako spätná kontrola na pozadie počas analýzy na detekciu interferujúcich látok alebo kontaminovaných pôd.

Všetky experimenty, vrátane kontrol a slepých pokusov, by sa mali uskutočniť minimálne duplicitne. Celkový počet vzoriek, ktoré by mali byť pripravené na štúdiu, je možné vypočítať s ohľadom na metodológiu, ktorá sa bude dodržiavať.

Metódy na úvodnú štúdiu a hlavnú štúdiu sú v podstate rovnaké, výnimky sa uvádzajú iba ak je to potrebné.

Vzduchom vysušené pôdne vzorky sa ustália do rovnovážneho stavu počas noci (12 h) pred dňom experimentu, trasením, s minimálnym objemom 45 cm^3 0,01 M $CaCl_2$. Následne sa pridá určitý objem zásobného roztoku testovanej látky, aby sa dosiahol konečný objem 50 cm^3. Tento pridaný objem pôvodného roztoku: a) by nemal prekročiť 10 % konečného 50 cm^3 objemu vodnej fázy v snahe čo najmenej zmeniť podstatu preekvilibrovaného roztoku a b) mal by pokiaľ možno vyústiť do počiatočnej koncentrácie testovanej látky, ktorá je v kontakte s pôdou (C_o) aspoň o dva rády vyššie ako je hodnota veličiny na limit detekcie analytickej metódy; táto prahová hodnota zabezpečí schopnosť vykonať presné merania, aj keď sú hodnoty adsorpcie väčšie ako 90 % a následne stanoviť adsorpčné izotermy. Odporúča sa, ak je to možné, aby počiatočná koncentrácia látky (C_o) neprekročila polovicu limitu jej rozpustnosti.

Príklad, ako sa počíta koncentrácia zásobného roztoku (C_{st}), je uvedený v nasledujúcom texte nižšie. Predpokladaný detekčný limit je 0,01 μg cm^{-3} a 90 % adsorpcia: tak by počiatočná koncentrácia testovanej látky v pôde mala byť 1 μg cm^{-3} (dva rády hodnoty vyššia ako detekčný limit). Predpokladajme, že sa pridá maximálny odporúčaný objem zásobného roztoku, t. j. od 5 do 45 cm^3 0,01 M $CaCl_2$ rovnovážneho roztoku (= 10 % zásobného roztoku ku 50 cm^3 celkového objemu vodnej fázy), koncentrácia zásobného roztoku by mala byť 10 μg cm^{-3}, toto sú o tri rády vyššie hodnoty ako je detekčný limit analytickej metódy.

Meranie pH vodnej fázy je potrebné vykonať pred a po kontakte s pôdou, pretože práve toto zohráva dôležitú úlohu v celom adsorpčnom procese, špeciálne na ionizovateľné látky.

▼B

Zlúčenina je až do bodu dosiahnutia adsorpčnej rovnováhy premiešavaná. Čas rovnováhy v pôdach je veľmi nestály a záleží od typu chemikálie a pôdy. Za dostatočne dlhé obdobie sa považuje 24 hodín (77). V predbežnej štúdii môžu byť vzorky zozbierané postupne počas 48 hodín miešania (napríklad pri 4, 8, 24, 48 hodinách). Aj napriek tomu by sa mal čas analýzy flexibilne zvážiť vzhľadom na pracovný program laboratória.

Sú dve možnosti, ako analyzovať testovanú látku vo vodnom roztoku: a) paralelná metóda, b) sériová metóda. Je potrebné zdôrazniť, že paralelná metóda je experimentálne viac zdĺhavá, matematické spracovanie výsledkov je jednoduchšie (dodatok 5). Výber metodológie je ponechaný na rozhodnutí experimentátora, ktorý musí zvážiť dostupné možnosti laboratórneho vybavenia a zdrojov/-prostriedkov.

a) Paralelná metóda: pripravia sa vzorky s rovnakým pomerom pôdy a roztoku, v daných časových intervaloch, tak ako to požaduje štúdia adsorpčnej kinetiky. Po ukončení odstreďovania a ak je to potrebné, aj filtrácie, vodná fáza z prvej trubice sa znova čo naj dôkladnejšie použije a následne sa zmeria, napríklad po 4 hodinách, z druhej trubice po 8 hodinách a z tretej po 24 hodinách atď.

b) Sériová metóda: pripraví sa iba duplikovaná vzorka na každý pomer pôdy a roztoku. V definovaných časových intervaloch, s cieľom oddelenia fáz, je zmes odstreďovaná. Malý alikvótny podiel vodnej fázy sa ihneď analyzuje na testovanú látku, následne potom pokračuje experiment s pôvodnou látkou. Ak sa aplikuje filtrácia po odstreďovaní, laboratórium by malo mať zariadenia potrebné na zaobchádzanie s malými vodnými podielmi. Odporúča sa, aby celkový objem odobratých podielov nepresiahol 1 % celkového objemu roztoku, aby sa významne nezmenil pomer pôdy a roztoku a aby sa znížilo množstvo rozpustenej látky využiteľnej na adsorpciu počas testu.

Percentuálna adsorpcia A_{t_i} sa vypočítava v každom časovom bode (t_i) na základe nominálnej počiatočnej koncentrácie a odmeranej koncentrácie v čase dávkovania (t_i) a opravenej o hodnotu slepého pokusu. Záznamy percentuálnej adsorpcie A_{t_i} oproti času (obr. 1 dodatok 5) sú vytvorené v záujme odhadu očakávaného výsledku rovnovážneho plató ([1]). Hodnota K_d je vypočítaná v ekvilibriu. Na základe hodnoty K_d, sú vybrané vhodné pomery pôdy a roztoku z obr. 1 tak, že adsorpčné percento presiahne 20 % a prednostne viac ako 50 % (61). Všetky aplikovateľné rovnice a princípy zobrazenia sú udané v časti o Údajoch a záznamoch v dodatku 5.

1.9.2.2. *Stanovenie rovnovážneho adsorpčného času a množstva adsorbovanéj látky v stave rovnováhy*

Ako už bolo spomenuté, zobrazenia A_{t_i} alebo C_{aq}^{ads} oproti času umožňuje odhad adsorpčného ekvilibria a množstvo testovanej látky adsorbovanej v ekvilibriu. Obrázky 1 a 2 nachádzajúce sa v dodatku 5 ukazujú príklady takých záznamov. Čas rovnováhy je potrebný, aby systém dosiahol plató.

([1]) Záznamy koncentrácie testovanej látky vo vodnej fáze C_{aq}^{ads} oproti času by sa mohli takisto použiť na odhad očakávaného výsledku rovnovážneho plató (pozri obr. 2 v dodatku 5).

▼B

Ak s určitou pôdou nie je nájdené plató, ale iba stály vzostup, môže to byť spôsobené komplikujúcimi činiteľmi, ako sú biodegradácia alebo nízka difúzia. Biodegradácia sa dá zistiť opakovaným experimentom so sterilizovanou vzorkou pôdy. Ak ani v tomto prípade nie je dosiahnuté plató, experimentátor by mal hľadať iné fenomény, ktoré by mohli byť zahrnuté v jeho špecifickej štúdii; toto by sa mohlo zabezpečiť vhodnou zmenou experimentálnych podmienok (teplota, čas premiešavania, pomery pôdy a roztoku). Je na rozhodnutí výskumného pracovníka, či je vhodné pokračovať v postupe testu aj napriek možnému zlyhaniu dosiahnutia rovnováhy.

1.9.2.3. *Adsorbcia na povrchu testovacích nádobiek a stabilita testovanej látky*

Niektoré informácie, týkajúce sa adorpcie testovanej látky na povrchu testovacích nádobiek, rovnako ako aj ich stability, sa dajú odvodiť z analýzy kontrolných vzoriek. Ak sú vyčerpané všetky bežné chyby analytickej metódy, mohla by byť na príčine abiotická degradácia a/alebo adsorbcia na povrchu testovacej nádoby. Rozdiel medzi týmito dvomi faktami sa dá dosiahnuť prostredníctvom očistenia stien testovacej nádoby so známym objemom vhodného rozpúšťadla a následného vyhodnotenia roztoku použitého na vymytie nádob na obsah testovanej látky. Ak sa na povrchu testovacích látok zistí adsorpcia, rozdiel demonštruje abiotickú nestabilitu testovanej látky. Ak bola zistená takáto adsorpcia, je nevyhnutné vymeniť materiál testovacích nádob. Údaje o adsorpcii na povrchu testovacích nádob získaných z tohto pokusu nemôžu byť priamo extrapolované na pokus pôdy a roztoku.

Ďalšie údaje o stabilite testovanej látky je možné odvodiť pomocou určenia parentálnej hmotnej bilancie. To znamená, že vodná fáza, extrahovaná z pôdy a stien testovacej nádoby, sa analyzuje na obsah testovanej látky. Rozdiel medzi pridanou hmotou testovanej chemikálie a sumou hmoty testovaných chemikálii vo vodnej fáze, extraktami pôdy a stenami testovacích nádob je rovný hmote odbúranej a/alebo nestálej a/alebo neextrahovanej. V záujme uskutočnenia hmotnostnej rovnováhy, adsorpčné ekvilibrium by malo byť dosiahnuté počas obdobia trvania experimentu.

Je potrebné dosiahnuť hmotnostnú rovnováhu na obidvoch pôdach a na pomer pôdy a roztoku na každú z pôd, čím sa dosiahne zníženie presahujúce 20 % a väčšie ako 50 % ekvilibria. Akonáhle je postup na zistenie pomeru ukončený spolu s analýzou poslednej vzorky vodnej fázy po 48 hodinách, fázy sa rozdelia odstreďovaním a ak je potrebné aj filtráciou. Vodná fáza sa znovu použije v takom množstve, aké je len možné a pridá sa primeraná extrakcia rozpúšťadla (extrakčný koeficient minimálne o hodnote 95 %) do pôdy na extrakciu testovanej látky. Sú odporúčané minimálne dve postupné extrakcie. Z množstva zistenej testovanej látky v pôde a v extrakte testovacích nádob sa vypočíta hmotnostná rovnováha (rovnica 10, Údaje a záznamy). Ak je táto hodnota menšia ako 90 %, testovaná látka sa považuje za nestabilnú v časovom rozpätí testu. Aj napriek tomu je možné v štúdii pokračovať, ak sa počíta s nestabilitou testovanej látky. V prípadoch, ako bol tento, sa však odporúča analyzovať obidve fázy v hlavnej štúdii.

▼B

1.9.2.4. *Rad 2 – Adsorpčná kinetika pri jednej koncentrácii testovanej látky*

Použije sa päť pôdnych typov, vybratých z tabuľky 1. Je vhodné do týchto piatich pôdnych typov zahrnúť niektoré alebo všetky pôdne typy použité v predbežnej štúdii. V takomto prípade sa rad 2 nemusí opakovať pri pôdach, ktoré boli zahrnuté v predbežnej štúdii.

Čas rovnováhy, pomer pôdy a roztoku, váha pôdnej vzorky, objem vodnej fázy v kontakte s pôdou a koncentrácia testovanej látky v roztoku sa zvolia na základe výsledkov predbežnej štúdie. Analýza by mala byť vykonaná po 2, 4, 6, 8, (možno aj po 10) a 24 hodinách kontaktného času, čas potrebný na trepanie môže byť predĺžený maximálne na 48 hodín, a to v prípade, ak chemikália vyžaduje dlhší ekvilibračný čas, rešpektujúc tak výsledok nájdeného pomeru. Aj napriek tomu by sa mal čas určený na analýzu flexibilne zvážiť.

Každý experiment (raz pôda a raz roztok) sa realizuje aspoň dvakrát, čo umožní stanoviť odchýlky výsledkov. Do každého pokusu sa zahrnie aj jeden blank – slepý pokus. Tento pozostáva z pôdy a roztoku 0,01 M $CaCl_2$, bez testovanej látky a váhy a objemu, respektívne je identický s tými, ktoré boli použité v experimente. Na kontrolnú vzorku s obsahom iba testovanej látky v roztoku 0,01 M $CaCl_2$ (bez pôdy) sa odporúča použiť ten istý testovací postup ako poistku pred niečím neočakávaným.

Adsorpčné percento sa vypočíta v každom časovom bode A_{t_i} a/alebo časovom intervale $A_{\Delta t_i}$ (podľa potreby) a je zaznamenávané oproti času. Distribučný koeficient K_d v ekvilibriu, tak ako aj organický uhlík normalizovaný adsorpčný K_{oc} (pre nepolárne organické chemikálie) sa taktiež vypočítajú.

Výsledky testu adsorbčnej kinetiky

Lineárna hodnota K_d je obyčajne vhodná na opísanie sorpčného správania v pôdach (35), (78) a reprezentuje vyjadrenie vlastnej pohyblivosti chemikálii v pôde. Napríklad vo všeobecnosti chemikálie s $K_d \leq 1$ cm^3 g^{-1} sú hodnotené ako kvalitatívne mobilné. Podobne aj mobilná klasifikačná schéma založená na hodnotách K_d bola získaná MacCall *et al.* (16). Dodatočne existujúce lúhovacie klasifikačné schémy sú založené na vzťahu medzi hodnotou K_{oc} a DT-50 ([1]) (32), (79).

Podľa štúdie chybných analýz (61) sa nedajú K_d hodnoty pod 0,3 cm^3 g^{-1} správne odhadnúť z poklesu koncentrácie vo vodnej fáze, aj keď je použitý najvhodnejší pomer pôdy a roztoku (z pohľadu presnosti), t. j. 1:1. V takomto prípade sa odporúča analýza obidvoch fáz, pôdy aj roztoku.

([1]) DT-50: čas rozkladu (degradation time) 50 % testovanej látky.

▼B

S ohľadom na uvedené sa odporúča, aby sa štúdia adsorpčného správania chemikálie v pôde a jej možná pohyblivosť doplnila o presné stanovenie Freundlichovej adsorbčnej izotermy u tých systémov, u ktorých je možné presné stanovenie hodnoty K_d za použitia postupu experimentálneho protokolu popísaného v tejto metóde. Presné stanovenie je možné v prípade, ak je hodnota výsledkov získaných násobením hodnôt K_d a pomeru pôdy a roztoku väčšia ako 0,3 v prípade, ak sú merania založené na koncentračnom poklese vo vodnej fáze (nepriama metóda), alebo ak je táto hodnota väčšia ako 0,1, v prípade analýzy obidvoch fáz (priama metóda) (61).

1.9.2.5. *Rad 3 – Adsorpčné izotermy a desorpčná kinetika/desorpčné izotermy*

1.9.2.5.1. Adsorpčné izotermy

Používa sa päť testovaných koncentrácií látok, obsahujúcich dva rády veličín, pri voľbe týchto koncentrácii by sa mala vziať do úvahy rozpustnosť vo vode a výsledná koncentračná rovnováha. Je potrebné zachovať rovnaký pomer pôdy a roztoku pre danú pôdu počas celej štúdie. Adsorpčný test sa vykoná tak, ako bolo spomenuté, s jediným rozdielom, a to, že vodná fáza sa analyzuje iba raz v čase nevyhnutnom na dosiahnutie rovnováhy, ako bolo uvedené v Rade 2. Rovnovážne koncentrácie v roztoku sú určené a množstvo adsorbovanej látky sa vypočíta zo straty testovanej látky v roztoku alebo priamou metódou. Adsorbovaná hmotnosť na jednotku hmotnosti pôdy je znázornená ako funkcia rovnovážnej koncentrácie testovanej látky (pozri Údaje a správa).

Výsledky experimentu adsorpčnej izotermy

Medzi matematickými adsorbčnými modelmi doteraz navrhnutými, Freundlichova izoterma je jedna z najčastejšie používaných na opísanie adsorbčných procesov. Detailnejšie informácie na interpretáciu a dôležitosť adsorbčných modelov sú uvedené v použitej literatúre (41), (45), (80), (81), (82).

Poznámka: Je potrebné uviesť, že porovnanie hodnôt K_F (Freundlichovho adsorpčného koeficientu) pre rôzne látky je možné iba v prípade, ak sú tieto hodnoty K_F vyjadrené v rovnakých jednotkách (83).

1.9.2.5.2. Desorpčná kinetika

Účelom tohto postupu je pozorovanie, či sú chemikálie reverzibilne alebo ireverzibilne adsorbované v pôde (na pôdnych vzorkách). Táto informácia je dôležitá, keďže desorpčný proces zohráva dôležitú úlohu pri správaní sa chemikálií na pôdu v teréne. A naviac, desorpčné údaje sú užitočné vstupy do počítačových modelov na simuláciu procesu lúhovania a rozpúšťacieho procesu. Ak sa požaduje desorpčná štúdia, odporúča sa, aby bola štúdia opísaná vopred pred vykonaním testu na každý systém, na ktorý sa stanovuje presná hodnota K_d pri vykonaní testu adsorpčnej kinetiky.

Podobne pri adsorpčnej kinetickej štúdii sú dve varianty na vykonanie kinetického experimentu: a) paralelná metóda a b) sériová metóda. Výber metodológie bude ponechaný na experimentátora, ktorý posúdi možné laboratórne vybavenie a zdroje.

▼B

a) Paralelná metóda: pre každú vzorku, ktorá bola vybraná na vykonanie desorpčnej štúdie, sa pripravia vzorky s tým istým pomerom pôda a roztok, a to toľkokrát, v koľkých časových intervaloch sa požaduje študovať desorpčnú kinetiku. Preferujú sa tie isté časové intervaly, ako by boli použité pri experimente adsorpčnej kinetiky; hoci celkový čas môže byť predĺžený pri meraní v závislosti od dosiahnutia rovnováhy systému. Pri každom pokuse (jedna pôda, jeden roztok) prebehne jeden slepý pokus. Každý pokus sa skladá z pôdy a 0,01 M roztoku $CaCL_2$ bez testovanej látky, hmotnosti a objemu, respektívne je identický s experimentom. Kontrolná vzorka ako testovacia látka v 0,01 M $CaCL_2$ v roztoku (bez soli) sa podrobí tomu istému testovaciemu postupu. Všetky zmesi pôdy s roztokom sa budú vytrepávať až do dosiahnutia adsorpčnej rovnováhy (ako je to uvedené v časti rad 2). Potom sa fázy oddelia odstreďovaním a vodná fáza sa oddelí tak, ako je to najlepšie možné. Oddelený roztok sa nahradí rovnakým objemom 0,01 M $CaCL_2$ v destilovanej vode bez testovacej látky a nová zmes sa znovu vytrepe. Vodná fáza z prvej trubice sa získa tak dôkladne, ako je to možné a odmeria sa po napr. 2 hodinách, z druhej trubice po 4 hodinách a z tretej po 6 hodinách atď., až kým sa nedosiahne desorpčná rovnováha.

b) Sériová metóda: po experimente adsorpčnej kinetiky sa zmes odstredí a vodná fáza sa oddelí tak, ako je to najlepšie možné. Oddelený objem roztoku sa nahradí rovnakým objemom 0,01 M $CaCL_2$ bez testovacej látky. Nová zmes sa znovu vytrepe, až kým sa nedosiahne desorpčná rovnováha. Počas tohto časového intervalu sa bude zmes odstreďovať, aby sa oddelili fázy. Malé alikvotné množstvo sa ihneď analyzuje na testovaciu látku; potom experiment pokračuje s pôvodnou zmesou. Objem každej alikvotnej časti by mal byť menší než 1 % z celkového objemu. Také isté množstvo čerstvého roztoku 0,01 M $CaCl_2$ sa pridá do zmesi, aby sa dodržal pomer na pôdu a roztok a vytrepávanie pokračuje až do ďalšieho časového intervalu.

Percento desorpcie sa vypočíta na každý meraný čas (bodovite)D_{t_i} a/alebo aj časový interval $D_{\Delta t_i}$ (podľa potrieb štúdie) a zaznamenáva sa proti času. Rovnovážny desorpčný koeficient K_{des} sa taktiež vypočíta. Všetky aplikovateľné rovnice sú uvedené v časti „Údaje a správa“ a v dodatku 5.

Výsledky z experimentu desorpčnej kinetiky

Bežné záznamy percenta desorpcie D_{t_j} a adsorpcie A_{t_j} voči času umožňujú stanoviť reverzibilitu adsorpčného procesu. Ak desorpčná rovnováha dosiahne dvakrát čas adsorpčnej rovnováhy a celková desorpcia je väčšia než 75 % adsorbovaného množstva, adsorpcia sa považuje za reverzibilnú.

1.9.2.5.3. Desorpčná izoterma

Na pôdach, ktoré sa používajú na adsorpčno izotermický experiment, sa stanovujú Freundlichove desorpčné izotermy. Desorpčný test sa uskutoční podľa postupu uvedeného v časti „Desorpčná kinetika“ s jedným rozdielom, že vodná fáza sa analyzuje iba raz pri desorpčnej rovnováhe. Desorbované množstvo testovanej látky sa určí výpočtom. Množstvo adsorbovanej látky, ktorá sa zadrží na pôde pri desorpčnej rovnováhe, sa zaznamená ako funkcia rovnovážnej koncentrácie testovanej látky v roztoku (pozri časť „Výsledky a správa“ a v dodatku 5).

▼B

2. **ÚDAJE A SPRÁVA**

Analytické výsledky sa udávajú v tabuľkovej forme (pozri dodatok 6). Zadávajú sa jednotlivé merania a vypočítané priemery. Adsorpčné izotermy sa znázorňujú graficky. Výpočty sa robia podľa postupu, ktorý je uvedený nižšie.

Na účel tohto testu je určené, že hmotnosť 1 cm^3 vodného roztoku je 1 g. Pomer pôdy a roztoku by sa mohol vyjadriť v hmotnostných alebo objemových jednotkách s tými istými číslami.

2.1. ADSORPCIA

Adsorpcia A_{t_i} je definovaná ako percento adsorbovanej látky na pôdu, ktoré sa vzťahuje na množstvo prítomné na počiatku testu podľa podmienok testu. Ak je testovacia látka stála a neadsorbuje sa viditeľne na stenách nádoby, A_{t_i} sa vypočíta na každý časový bod t_i podľa rovnice:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (3)$$

kde:

A_{t_i} = adsorpčné percento na časový bod t_i (%);

$m_s^{ads}(t_i)$ = hmotnosť adsorbovanej testovanej látky na pôdu v čase t_i (µg);

m_o = hmotnosť testovanej látky v testovacej trubke na začiatku testu (µg).

Podrobné informácie, ako sa dá vypočítať percento adsorpcie A_{t_i} pre paralelné a sériové metódy, je uvedený v dodatku 5.

Distribučný koeficient K_d je pomer medzi obsahom látky v pôdnej fáze a hmotnostnou koncentráciou látky vo vodnom roztoku za podmienok testu v stave dosiahnutia adsorpčnej rovnováhy.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} \ (cm^3 \ g^{-1}) \qquad (4)$$

kde:

$C_s^{ads}(eq)$ = obsah látky adsorbovanej na pôde pri adsorpčnej rovnováhe (µg g^{-1});

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = hmotnostná koncentrácia látky vo vodnej fáze pri adsorpčnej rovnováhe (µg cm-^{3}). Táto koncentrácia sa stanoví pomocou hodnôt získaných zo slepého pokusu

$m_s^{ads}(eq)$ = obsah látky adsorbovanej na pôde pri adsorpčnej rovnováhe (µg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = obsah látky adsorbovanej v roztoku pri adsorpčnej rovnováhe (µg);

m_{soil} = množstvo pevnej fázy, vyjadrenej ako sušina (suchá pôda) (g);

V_o = počiatočný objem vodnej fázy v styku s pôdou (cm^3).

Vsťah medzi $A_{eq\ a}$ K_d je daný

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} \ (cm^3 \ g^{-1}) \qquad (5)$$

▼B

kde:

A_{eq} = percento adsorpcie pri adsorpčnej rovnováhe, %.

Organický uhlík normalizovaný adsorpčný koeficient K_{oc} súvisí s distribučným koeficientom K_d k obsahu organického uhlíka vo vzorke pôdy:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} (cm^3\ g^{-1}) \quad (6)$$

kde:

%OC = percento organického uhlíka vo vzorke pôdy (g g^{-1}).

K_{oc} koeficient predstavuje jednoduchú hodnotu, ktorá charakterizuje účasť vo väčšine nepolárnych organických zlúčenín medzi organickým uhlíkom v pôde alebo sedimentom a vodou. Adsorpcia týchto chemikálií sa koreluje na obsah organicky sorbujúcej tuhej látky (7), kde hodnoty K_{oc} závisia od špecifických charakteristík glejovitých frakcií, ktoré sa významne odlišujú v sorpčnej kapacite vzhľadom na odlišnosti v pôvode, vývoji atď.

2.1.1. **Adsorpčné izotermy**

Rovnica pre Freundlichove adsorpčné izotermy súvisí s množstvom adsorbovanej testovanej látky ku koncentrácii testovanej látky v roztoku pri rovnováhe (rovnica 8).

Výsledky sa triedia ako „adsopcia“ a na každú testovaciu trubicu, obsah adsorbovanejtestovacej látky na pôdu po adsorbčnom teste [$C_s^{ads}(eq)$, je niekde inde označená ako x/m] sa vypočíta. Predpokladá sa, že rovnováha bola dosiahnutá a $C_s^{ads}(eq)$ reprezentuje hodnotu rovnováhy:

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right] \cdot V_0}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (7)$$

Freundlichova adsorpčná rovnica je zobrazená v (8).

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} (\mu g\ g^{-1}) \quad (8)$$

alebo v lineárnom tvare:

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

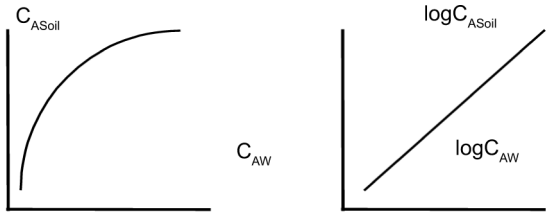
kde:

K_F^{ads} = Freundlichov adsorbčný koeficient; jeho rozmer je $cm^3\ g^{-1}$. Len ak l/n = 1; vo všetkých ostatných prípadoch strmosť l/n je daná rozmerom K_F^{ads} $(\mu g^{1-1/n} (cm^3)^{1/n} g^{-1})$;

n = regresná konštanta; l/n bežný rozsah je v rozpätí 0,7 – 1,0, indikuje, že sorpčné údaje sú často mierne nelineárne.

Rovnice (8) a (9) sú zaznamenané a hodnoty K_F^{ads} a l/n sú vypočítané regresnou analýzou s využitím rovnice (9). Korelačný koeficient r^2 z logaritmickej rovnice je tiež vypočítaný. Príklad takéhoto zobrazenia je na obr.2.

▼B



Obr. 2. Freundlichova adsorpčná krivka normálna a linearizovaná

2.1.2. **Hmotnostná bilancia**

Hmotnostná bilancia (MB) je definovaná ako percento látky, ktorá môže byť analyticky obnovená po adsorpcii testu oproti počiatočnému množstvu látky na začiatku testu.

Spracovanie výsledkov sa bude líšiť, ak je rozpúšťadlo kompletne miešateľné s vodou. V prípade vodou miešateľného rozpúšťadla je spracovanie výsledkov opísané v časti „Opis“, môže byť aplikované na stanovenie množstva látky obnovenej po extrakcii rozpúšťadla. Ak je rozpúšťadlo menej miešateľné s vodou, stanovenie/určenie obnoveného množstva sa musí stanoviť.

Hmotnostná bilancia MB na adsorpciu sa vypočíta nasledovne: vychádza sa z toho, že údaj (m_E) korešponduje so sumou hmotností testovaných chemikálií extrahovaných z pôdy a povrchu testovaných pojív s rozpúšťadlom.

$$MB = \frac{\left(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E\right) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} (\%) \qquad (10)$$

kde:

MB = hmotnostná bilancia (%);

m_E = celková hmotnosť testovanej látky vyextrahovanej z pôdy a stien testovacej nádoby v dvoch krokoch (μg);

C_o = počiatočná hmotnostná koncentrácia testovaného roztoku v styku s pôdou (μg cm^{-3});

V_{rec} = objem kalu obnoveného po adsorpčnej rovnováhe (cm^{-3}).

2.2. DESORPCIA

Desorpcia (D) je definovaná ako percento testovanej látky, ktoré je desorbované, vztiahnuté ku kvantite látky, ktorá bola adsorbovaná predtým za testovacích podmienok.

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \qquad (11)$$

kde:

D_{t_i} = desorpčné percento v jednotkovom bode/čase t_i (%);

▼B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = hmotnosť testovanej látky desorbovanej z pôdy v časovom bode t_i (μg);

$m_s^{ads}(eq)$ = hmotnosť testovanej látky adsorbovanej do pôdy pri adsorpčnej rovnováhe (μg).

Podrobné informácie o tom, ako sa má postupovať pri výpočte percenta desorpcie D_{t_i} paralelnej a sériovej metóde, sú uvedené v dodatku 5.

Zjavný desorpčný koeficient (K_{des}) je, za podmienok testu, pomer medzi obsahom lát zadržanej v pôde a hmotnostnou koncentráciou desorbovanej látky vo vodnom roztoku dosiahnutí desorpčnej rovnováhy.

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} (cm^3\ g^{-1}) \quad (12)$$

kde:

K_{des} = dessorpčný koeficient ($cm^3\ g^{-1}$);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = celková hmotnosť testovanej látky desorbovanej z pôdy pri desorpčnej rovnováhe (μg);

V_T = celkový objem vodnej fázy v kontakte s pôdou počas desorpčných kinetických testov (cm^3).

Návod na výpočet $m_{aq}^{des}(eq)$ je uvedený v dodatku 5, v časti pod názvom „Desorpcia“.

Poznámka

Ak bol urobený adsorpčný test, ktorý sa vykonal paralelnou metódou, objem V_T v rovnici 12 by mal byť rovnaký s objemom V_o.

2.2.1. **Desorpčné izotermy**

Rovnica pre Freundlichove desorpčné izotermy udáva vzťah obsahu testovanej látky, zadržanej adsorpciou na vzorke pôdy, ku koncentrácii testovanej látky v roztoku pri adsorpčnej rovnováhe (rovnica 16).

Pre každú testovaciu trubicu sa obsah látky zadržanej adsorbciou na pôdnej vzorke pri desorpčnej rovnováhe vypočíta nasledovne:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu g\ g^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ je definovaná ako:

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^A (\mu g) \quad (14)$$

kde:

$C_s^{des}(eq)$ = obsah testovanej látky zadržanej na pôdnej vzorke pri desorpčnej rovnováhe (μg g^{-1});

$m_m^{des}(eq)$ = hmotnosť látky stanovenej analyticky vo vodnej fáze pri desorpčnej rovnováhe (μg);

▼B

m_{aq}^{A} = hmotnosť zostatkovej testovanej látky po adsorpčnej rovnováhe ku nekompletnému náhradnému objemu (μg);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = hmotnosť látky v roztoku pri adsorpčnej rovnováhe (μg);

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (15)$$

V_r^F = objem odobratého roztoku z trubice na stanovenie testovanej látky pri adsorpčnej rovnováhe (cm^3);

V_R = objem glejovitého roztoku odobratého z trubice po dosiahnutí adsorpčnej rovnováhy a nahradení toho istého objemu 0,01M roztokom $CaCl_2$ (cm^3);

Freundlichova desorpčná rovnica je v (16):

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} \ (\mu g \ g^{-1}) \quad (16)$$

alebo v lineárnom tvare:

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{des}(eq) \quad (17)$$

kde:

K_F^{des} = Freundlichov desorpčný koeficient;

n = regresná konštanta;

$C_{aq}^{des}(eq)$ = hmotnostná koncentrácia látky vo vodnej fáze pri desorpčnej rovnováhe (μg cm^{-3}).

Rovnice 16 a 17 sa môžu znázorniť a hodnoty K_F^{des} a vypočítajú sa z regresnej analýzy použitím rovnice 17.

Poznámka

Ak Freundlichov adsorpčný alebo desorpčný exponent l/n je rovný 1, Freundlichova adsorpčná alebo desorpčná väzobná konštanta (K_F^{ads} a K_F^{des}) bude rovná adsorbčnej a desorpčnej rovnovážnej konštante (K_d a K_{des}) respektívne, a záznamy C_s a C_{aq} budú lineárne. Ak exponent nie je rovný 1, záznamy C_s a C_{aq} nebudú lineárne a adsorpčná a desorpčná konštanta sa budú meniť pozdĺž izotermy.

2.2.2. **Správa z testu**

Správa z testu má obsahovať nasledovné informácie:

— kompletnú identifikáciu použitých pôdnych vzoriek vrátane:

— geografické odkazy o mieste (zemepisná šírka, zemepisná dĺžka),

— dátum vzorkovania,

▼B

— použitý vzor (poľnohospodárska pôda, les atď.),

— hĺbka vzorkovania,

— obsah piesku (bahna alebo ílu),

— pH hodnoty (v 0,01 M $CaCl_2$),

— obsah organického uhlíka,

— obsah organickej hmoty,

— obsah dusíka,

— pomer C/N,

— kapacita výmeny katiónov (mmol/kg),

— všetky informácie súvisiace s kumuláciou, skladovaním pôdnych vzoriek,

— kde je to vhodné, všetky relevantné informácie na interpretáciu adsorpcie/desorpcie testovanej látky,

— odkazy na metódy použité pre stanovenie každého parametra,

— informácie o testovanej látke, ak je to potrebné,

— teplota pri experimente,

— podmienky na odstreďovanie,

— analytický postup použitý na analýzu testovanej látky,

— rozhodnutie o výbere rozpúšťacieho činidla na prípravu zásobného roztoku testovanej látky,

— ak je to relevantné, uviesť korelácie robené výpočtom,

— údaje v súlade s prepisom ako je to v dodatku 6 a grafické znázornenie,

— všetky informácie a pozorovania, ktoré môžu byť nápomocné pri interpretácii výsledkov testu.

3. **POUŽITÁ LITERATÚRA**

(1) Kukowski H. and Brümmer G., (1987). Investigations on the Adsorption and Desorption of Selected Chemicals in Soils. UBA Report 106 02045, Part II.

(2) Fränzle O., Kuhnt G. and Vetter L., (1987). Selection of Representative Soils in the EC-Territory. UBA Report 106 02045, Part I.

(3) Kuhnt G. and Muntau H. (Eds.) EURO-Soils: Identification, Collection, Treatment, Characterisation. Special Publication No 1.94.60, Joint Research Centre. European Commission, ISPRA, December 1994.

(4) OECD Test Guidelines Programme, Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18 – 20 January 1995 (June 1995).

(5) US Environment Protection Agency: Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N, Chemistry: Environmental Fate, Series 163-1, Leaching and Adsorption/Desorption Studies, Addendum 6 on Data Reporting, 540/09-88-096, Date: 1/1988.

▼B

(6) US Environment Protection Agency: Prevention, Pesticides and Toxic Substances, OPPTS Harmonized Test Guidelines, Series 835-Fate, Transport and Transformation Test Guidelines, OPPTS No: 835.1220 Sediment and Soil Adsorption/Desorption Isotherm. EPA No: 712-C-96-048, April 1996.

(7) ASTM Standards, E 1195-85, Standard Test Method for Determining a Sorption Constant (K_{oc}) for an Organic Chemical in Soil and Sediments.

(8) Agriculture Canada: Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada, 15 July 1987.

(9) Netherlands Commission Registration Pesticides (1995): Application for registration of a pesticide. Section G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(10) Danish National Agency of Environmental Protection (October 1988): Criteria for registration of pesticides as especially dangerous to health or especially harmful to the environment.

(11) BBA (1990), Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, Biological Research Centre for Agriculture and Forestry, Braunschweig, Germany.

(12) Calvet R., (1989), „Evaluation of adsorption coefficients and the prediction of the mobilities of pesticides in soils“, in Methodological Aspects of the Study of Pesticide Behaviour in Soil (ed. P. Jamet), INRA, Paris, (Review).

(13) Calvet R., (1980), „Adsorption-Desorption Phenomena“ in Interactions between herbicides and the soil. (R. J. Hance ed.), Academic Press, London, pp. 83 – 122.

(14) Hasset J. J., and Banwart W.L., (1989), „The sorption of nonpolar organics by soils and sediments“ in Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. Soil Science Society of America (S.S.S.A), Special Publication no. 22, pp. 31 – 44.

(15) Van Genuchten M. Th., Davidson J. M., and Wierenga P. J., (1974), „An evaluation of kinetic and equilibrium equations for the prediction of pesticide movement through porous media“. Soil Sci. Soc. Am. Proc, Vol. 38(1), pp. 29 – 35.

(16) McCall P. J., Laskowski D. A., Swann R. L., and Dishburger H. J., (1981), „Measurement of sorption coefficients of organic chemicals and their use, in environmental fate analysis“, in Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants. Proceedings of AOAC Symposium, AOAC, Washington DC.

(17) Lambert S. M., Porter P. E., and Schieferrstein R. H., (1965), „Movement and sorption of chemicals applied to the soil“. Weeds, 13, pp. 185 – 190.

(18) Rhodes R. C, Belasco I. J., and Pease H. L., (1970) „Determination of mobility and adsorption of agrochemicals in soils“. J.Agric.Food Chem., 18, pp. 524 – 528.

(19) Russell M. H., (1995), „Recommended approaches to assess pesticide mobility in soil“ in Environmental Behavior of Agrochemicals (ed. T. R. Roberts and P. C. Kearney). John Wiley & Sons Ltd.

(20) Esser H. O., Hemingway R. J., Klein W., Sharp D. B., Vonk J. W. and Holland P. T., (1988), „Recommended approach to the evaluation of the environmental behavior of pesticides“, IUPAC Reports on Pesticides (24). Pure Appl. Chem., 60, pp. 901 – 932.

▼B

(21) Guth J. A., Burkhard N., and D. O. Eberle, (1976), „Experimental models for studying the persistence of pesticides in soils“. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, pp. 137 – 157, BCPC, Surrey, UK.

(22) Furminge C. G. L., and Osgerby J. M., (1967), „Persistence of herbicides in soil“. J. Sci. Fd Agric, 18, pp. 269 – 273.

(23) Burkhard N., and Guth J. A., (1981), „Chemical hydrolysis of 2-Chloro-4,6-bis(alkylamino)-l,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption“. Pestic. Sci. 12, pp. 45 – 52.

(24) Guth J. A., Gerber H. R., and Schlaepfer T., (1977), „Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides“. Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, pp. 961 – 971.

(25) Osgerby J. M., (1973), „Process affecting herbicide action in soil“. Pestic. Sci., 4, pp. 247 – 258.

(26) Guth J. A., (1972), „Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Bôden“. Schr. Reihe Ver. Wass. -Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, pp. 143 – 154.

(27) Hamaker J. W., (1975), „The interpretation of soil leaching experiments“, in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), pp. 135 – 172, Plenum Press, NY.

(27) Helling C. S., (1971), „Pesticide mobility in soils“. Soil Sci. Soc. Amer. Proc, 35, pp. 732 – 210.

(29) Hamaker J. W., (1972), „Diffusion and volatilization“ in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J. W. Hamaker eds), Vol. I, pp. 49 – 143.

(30) Burkhard N. and Guth J. A., (1981), „Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system“. Pestic. Sci. 12, pp. 37 – 44.

(31) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses“, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297 – 325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(32) Gustafson D. I., (1989), „Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide teachability“. J. Environ. Toxic. Chem., 8(4), pp. 339 – 357.

(33) Leistra M., and Dekkers W. A., (1976). „Computed effects of adsorption kinetics on pesticide movement in soils“. J. of Soil Sci., 28, pp. 340 – 350.

(34) Bromilov R. H., and Leistra M., (1980), „Measured and simulated behavior of aldicarb and its oxydation products in fallow soils“. Pest. Sci., 11, pp. 389 – 395.

(35) Green R. E., and Karickoff S. W., (1990), „Sorption estimates for modeling“, in Pesticides in the Soil Environment: Process, Impacts and Modeling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am., Book Series no. 2, pp. 80 – 101,

(36) Lambert S. M., (1967), „Functional relationship between sorption in soil and chemical structure“. J. Agri. Food Chem., 15, pp. 572 – 576.

▼B

(37) Hance R. J., (1969), „An empirical relationship between chemical structure and the sorption of some herbicides by soils“. J. Agri. Food Chem., 17, pp. 667 – 668.

(38) Briggs G. G. (1969), „Molecular structure of herbicides and their sorption by soils“. Nature, 223, 1288.

(39) Briggs G. G. (1981). „Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor“. J. Agric. Food Chem., 29, pp. 1050 – 1059.

(40) Sabljic A., (1984), „Predictions of the nature and strength of soil sorption of organic polutance by molecular topology“. J. Agric. Food Chem., 32, pp. 243 – 246.

(41) Bailey G. W., and White J. L., (1970), „Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil“. Residue Rev., 32, pp. 29 – 92.

(42) Bailey G. W., J. L. White and Y. Rothberg., (1968), „Adsorption of organic herbicides by montomorillonite: Role of pH and chemical character of adsorbate“. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 32: pp. 222 – 234.

(43) Karickhoff S. W., (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils“. Chemosphere 10, pp. 833 – 846.

(44) Paya-Perez A., Riaz M. and Larsen B., (1989), „Soil Sorption of 6 Chlorobenzenes and 20 PCB Congeners“. Environ. Toxicol. Safety 21, pp. 1 – 17.

(45) Hamaker J. W., and Thompson J. M., (1972), „Adsorption in organic chemicals“ in Organic Chemicals in the Soil Environment (Goring C.A.I. and Hamaker J.W., eds), Vol I and II, Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1972, pp. 49 – 143.

(46) Deli J., and Warren G. F., 1971, „Adsorption, desorption and leaching of diphenamid in soils“. Weed Sci. 19: pp. 67 – 69.

(47) Chu-Huang Wu, Buehring N., Davinson J. M. and Santelmann, (1975), „Napropamide Adsorption, desorption and Movement in soils“. Weed Science, Vol. 23, pp. 454 – 457.

(48) Haues M. H. B., Stacey M., and Thompson J. M., (1968), „Adsorption of s-triazine herbicides by soil organic preparations“ in Isotopes and Radiation in Soil Organic Studies, p.75, International. Atomic Energy Agency, Vienna.

(49) Pionke H. B., and Deangelis R. J., (1980), „Methods for distributing pesticide loss in field run-off between the solution and adsorbed phase“, CREAMS, in A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.

(50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality S General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).

(51) Scheffer F., and Schachtschabel, Lehrbuch der Bodenkunde, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.

(52) Black, Evans D. D., White J. L., Ensminger L. E., and Clark F. E., eds. „Methods of Soil Analysis“, Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼B

(53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality Š Sampling Š Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.

(54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality Š Sampling Š Part 2: Guidance on sampling techniques.

(55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality S Sampling S Part 3: Guidance on safety of sampling.

(56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality Š Sampling Š Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.

(57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality S Sampling S Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.3

(58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality Š Sampling Š Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(59) Green R. E., and Yamane V. K., (1970), „Precision in pesticide adsorption measurements“. Soil Sci. Am. Proc., 34, pp. 353 – 354.

(60) Grover R., and Hance R. J. (1970), „Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine“. Soil Sci., pp. 109 – 138.

(61) Boesten, J. J. T. I, „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system“. Pest. Sci. 1990, 30, pp. 31 – 41.

(62) Boesten, J. J. T. I. „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106“. Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26 – 29. April 1994.

(63) Bastide J., Cantier J. M., et Coste C, (1980), „Comportement de substances herbicides dans le sol enfonction de leur structure chimique“. Weed Res. 21, pp. 227 – 231.

(64) Brown D. S., and Flagg E. W., (1981), „Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments“. J. Environ.Qual., 10(3), pp. 382 – 386.

(65) Chiou C. T., Porter P. E., and Schmedding D. W., (1983), „Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water“. Environ. Sci. Technol., 17(4), pp. 227 – 231.

(66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), „Sorption of organic substances by soils and sediments“. J. Environm. Sci. Health, B19 (3), pp. 297 – 312.

(67) Vowles P. D., and Mantoura R. F. C, (1987), „Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons“. Chemosphere, 16(1), pp. 109 – 116.

(68) Lyman W. J., Reehl W. F.and Rosenblatt D. H. (1990). Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds. American Chemical Society, Washington DC.

(69) Keniga E. E., and Goring, C. A. I. (1980). „Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota“ in Aquatic Toxicology (eds J.G Eaton, et al.), pp. 78 – 115, ASTM STP 707, Philadelphia.

▼B

(70) Chiou C. T., Peters L. J., and Freed V. H., (1979), „A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds“. Science, Vol. 206, pp. 831 – 832.3

(71) Hassett J. J., Banwart W. I., Wood S. G, and Means J. C, (1981), „Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption“. Soil Sci. Soc. Am. J. 45, pp. 38 – 42.

(72) Karickhoff S. W., (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils“. Chemosphere, Vol. 10(8), pp. 833 – 846.

(73) Moreale A., van Bladel R., (1981), „Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité-reactivité“. Revue de l'Agric., 34 (4), pp. 319 – 322.

(74) M., Kôrdel W. (1996), „Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil“. Chemosphere, 32(12), pp. 2493 – 2504.

(75) Kôrdel W., Kotthoff G, Muller M. (1995), „HPLC Š screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil S results of a ring test“. Chemosphere 30 (7), pp. 1373 – 1384.

(76) Kôrdel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), „HPLC Š screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil S comparison of different stationary phases“. Chemosphere 27 (12), str. 2341 – 2352.

(77) Hance, R. J., (1967), „The Speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides“. Weed Research, Vol. 7, str. 29 – 36.

(78) Koskinen W. C, and Harper S. S., (1990), „The retention processes: mechanisms“ in Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling (ed. H.H. Cheng). Soil Sci. Soc. Am. Book Series, No. 2, Madison, Wisconsin.

(79) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R. F., and Enfield C. G (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses“, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297 – 325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.

(80) Giles C. H., (1970), „Interpretation and use of sorption isotherms“ in Sorption and Transport Processes in Soils. S.C.I. Monograph No. 37, str. 14 – 32.

(81) Giles, C. H.; McEwan J. H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D, (1960), „Studies in adsorption: XI. A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils“. J. Chem. Soc, str. 3973 – 93.

(82) Calvet R., Tercé M., and Arvien J. C, (1980), „Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques generales de l'adsorption“. Ann. Agron. 31: str 239 – 251.

(83) Bedbur E., (1996), „Anomalies in the Freundlich equation“, Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment, 13 – 15 May 1996, Stratford-upon-Avon, UK.

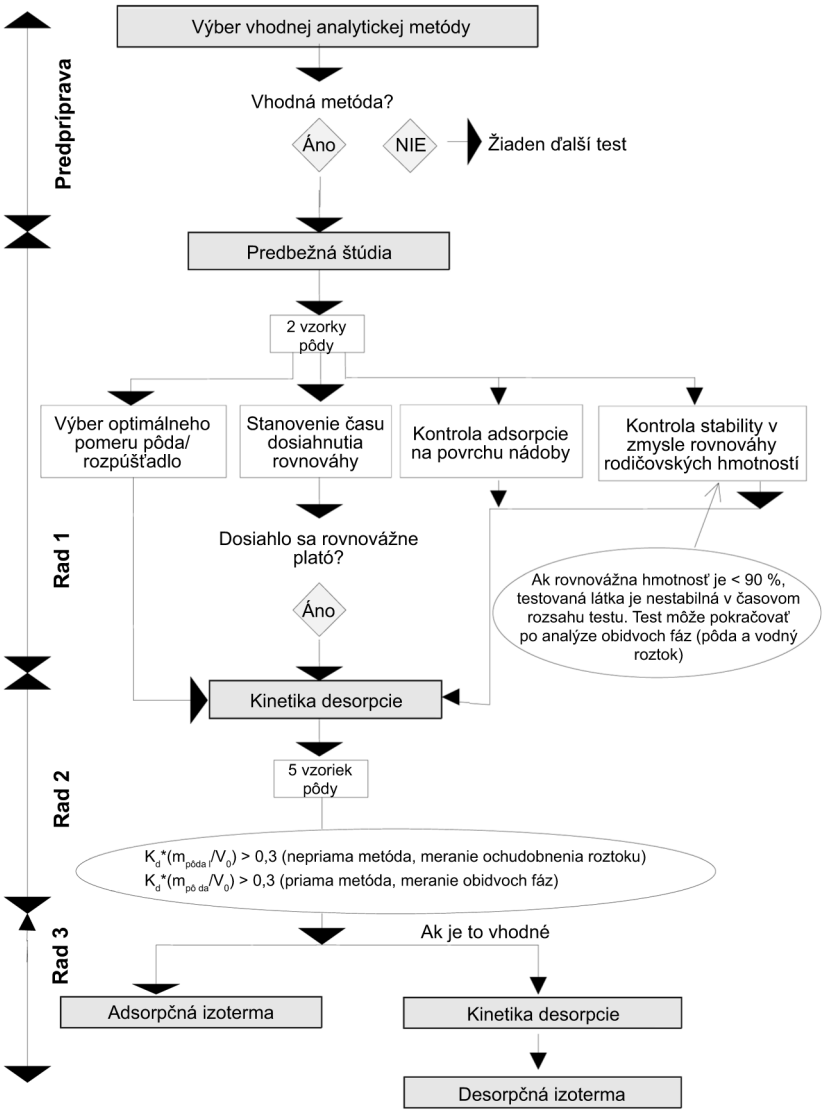
(84) Guth, J. A., (1985), „Adsorption/desorption“, in Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment, July 1 – 3, Canterbury, UK.

(85) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

▼B

DODATOK 1

Schéma testu



▼B

DODATOK 2

VPLYV PRESNOSTI ANALYTICKEJ METÓDY A KONCENTRAČNÝCH ZMIEN NA PRESNOSŤ VÝSLEDKOV ADSORPCIE

Z nasledujúcej tabuľky (8.4) vyplýva, že rozdiel medzi počiatočnou hmotnosťou (m_0 = 110 µg) a rovnovážnou hmotnosťou ($m_{aq}^{ads}(eq)$= 100 µg) testovanej látky v roztoku je veľmi malý, 5 % odchýlka pri meraní výsledkov rovnovážnej hmotnosti sa prejaví 50 % odchýlkou vo výpočte hmotnosti látky absorbovanej v pôde ($m_s^{ads}(eq)$)a 52,4 % vo výpočte K_d.

Množstvo pôdy $m_{pôda}$ = 10 g

Objem roztoku V_0 = 100 cm^3

	$m_{aq}^{ads}(eq)$ (µg)	$C_{aq}^{ads}(eq)$ (µg cm^{-3})	R	$m_s^{ads}(eq)$* (µg)	$C_s^{ads}(eq)$* (µg g^{-1})	R‡	K_d*	R‡
	PRE A = 9 %							
m_0 = 110 µg alebo C_0 = 1,100 µg/cm3	100	1,000	skutočná hodnota	10	1,00	skutočná hodnota	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
	PRE A = 55 %							
m_0 = 110 µg alebo C_0 = 1,100µg/cm3	50,0	0,500	skutočná hodnota	60,0	6,00	skutočná hodnota	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
	PRE A = 99 %							
m_0 = 110 µg alebo C_0 = 1,100 µg/cm3	1,100	0,011	skutočná hodnota	108,9	10,89	skutočná hodnota	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

kde:

$$*m_s^{ads}(eq) = m_0 - m_{aq}^{ads}(eq),\ C_s^{ads}(eq) = \frac{\left[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)\right] V_0}{m_{soil}} \cdot Kd = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \frac{V_0}{m_{soil}}$$

$m_s^{ads}(eq)$ = hmotnosť testovanej látky v pôde v rovnovážnom stave, µg;

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = hmotnosť látky v roztoku v čase adsorpčnej rovnováhy, µg;

$C_s^{ads}(eq)$ = obsah testovanej látky v pôdnej faze v rovnovážnom stave, µg g^{-1}:

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = hmotnostná koncentrácia testovanej látky vo vodnej fáze v rovnovážnom stave, µg cm^{-3}

R = analytlická odchýlka pri stanovení $m_{aq}^{ads}(eq)$;

R‡ = vypočítaná odchýlka spôsobená analytickou chybou R.

▼B

DODATOK 3

TECHNIKA ODHADU K_d

1. Technika odhadu umožňuje predpoklad K_d na základe korelácie, napr. s hodnotami P_{ow} (12), (39), (63 – 68), s údajmi o rozpustnosti vo vode (12), (19), (21), (39), (68 – 73) alebo s údajmi o polarite získanými uplatnením HPLC na obrátených fázach (74 – 76). Ako je vidieť z tabuliek 1 a 2, hodnoty K_{oc} a K_{om} sa vypočítavajú podľa týchto rovníc a potom nepriamo, K_d podľa týchto rovníc:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \ (cm^3\ g^{-1}) \qquad K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%oc} \ (cm^3\ g^{-1})$$

2. Podstata týchto korelácií je založená na dvoch predpokladoch: (1) na organickej podstate pôdy, hlavne jej vplyvoch na adsorpciu látky a (2) na interakciách, hlavne medzi nepolárnymi látkami. Výsledkom týchto korelácií je: (1) nie sú alebo sú iba do istej miery aplikovateľné na polárne látky a (2) sú neaplikovateľné v prípadoch, kde obsah organickej látky v pôde je veľmi malý (12). Okrem toho, hoci medzi P_{ow} a adsorpciou (19) bola zistená uspokojivá súvzťažnosť, to isté sa nedá tvrdiť o vzťahu medzi rozpustnosťou vo vode a rozpätím adsorpcie (19), (21); keďže sú štúdie ohľadom tejto témy veľmi protichodné.

3. V tabuľkách 1 a 2 sú uvedené niektoré príklady korelácií medzi adsorpčným koeficientom a rozdeľovacím koeficientom pre oktanol-voda, ako aj rozpustnosť vo vode.

Tabuľka 1

Príklady korelácií medzi adsorpčným koeficientom a rozdeľovacím koeficientom pre oktanol-voda, ďalšie príklady pozri (12) (68).

Látky	Korelácie	Autori
Substituované močoviny	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Chlórované aromáty	$\log K_{oc} = - 0,779 + 0,904 \log P_{ow}$	Chiou *et al.* (1983) (65)
Rôzne prípravky na ochranu rastlín	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$	Gerstl and Mingelgrin (1984) (66)
Aromatické uhľovodíky	$\log K_{oc} = - 2,53 + 1,15 \log P_{ow}$	Vowles and Mantoura (1987) (67)

Tabuľka 2

Príklady korelácií medzi adsorpčným rozdeľovacím koeficientom a rozpustnosťou vo vode; ďalšie príklady pozri (68) (69).

Látky	Korelácie	Autori
Rôzne prípravky na ochranu rastlín	$\log K_{om} = 3,8 – 0,561 \log S_w$	Gerstl and Mingelgrin (1984)(66)
Alifatické, aromatické chlórované látky	$\log K_{om} = (4,040 +/– 0,038) – (0,557 +/– 0,012) \log S_w$	Chiou *et al.* (1979) (70)
α-naftol	$\log K_{oc} = 4,273 – 0,686 \log S_w$	Hasset *et al*. (1981) (71)
Cyklické, alifatické aromatické látky	$\log K_{oc} = - 1,405 – 0,921 \log S_w - 0,00953$ (mp-25)	Karickhoff(1981)(72)
Rôzne zlúčeniny	$\log K_{om} = 2,75 – 0,45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼B

DODATOK 4

VÝPOČTY NA DEFINOVANIE PODMIENOK ODSTREĎOVANIA

1. Čas odstreďovania je stanovený nasledujúcim vzorcom za predpokladu, že častice majú sférický tvar:

$$t = \frac{9}{2}\left[\frac{\eta}{\omega^2 rp^2(\rho_s - \rho_{aq})}\right] \ln (R_b/R_t) \qquad (1)$$

Na zjednodušenie sú všetky parametre popísané v jednotkách SI (g, cm).

Kde:

ω = rýchlosť rotácie (=2 π rpm/60), rad s^1;

rpm = počet otáčok za minútu;

η = viskozita roztoku, g s^{-1} cm^{-1};

r_p = polomer častice, cm;

ρ_s = hustota pôdy (merná hmotnosť), g cm^{-3};

ρ_{aq} = hustota roztoku (merná hmotnosť), g cm^{-3};

R_t = vzdialenosť od stredu rotora odstredivky po vrchol roztoku v odstred'ovacej skúmavke, cm;

R_b = vzdialenosť od stredu rotora odstredivky po spodok roztoku v odstred'ovacej skúmavke, cm;

$R_b - R_t$ = výška stĺpca zmesi pôdy a roztoku v odstred'ovacej skúmavke, cm.

V bežnej praxi sa používa dvojnásobok vypočítaného času odstreďovania, aby sa zaistila úplná separácia.

2. Rovnica (1) sa dá ďalej zjednodušiť, ak budeme považovať dynamickú viskozitu (η) a hustotu [mernú hmotnosť] (ρ_{aq}) roztoku za rovnú dynamickej viskozite a hustote vody pri 25 °C, teda $\eta = 8{,}95 \times 10^{-3}$ g.s^{-1} cm^{-1} a $\rho_{aq} = 1{,}0$ g. cm^{-3}.

Potom je čas odstreďovania daný rovnicou (2):

$$t = \frac{3.7}{(rpm)^2 \cdot r_p^2(\rho_s - 1)} \ln \frac{Rb}{Rt} \qquad (2)$$

3. Z rovnice (2) je zrejmé, že nasledujúce dva parametre sú dôležité na definovanie podmienok odstreďovania, t. j. čas t) a rýchlosť (rpm), aby sa dosiahla separácia častíc so špecifickou veľkosťou (v našom prípade priemer častíc 0,1 μm): merná hmotnosť pôdy a (2) výška stĺpca zmesi v odstreďovacej skúmavke ($R_b - R_t$), t. j. vzdialenosť, ktorú častica pôdy pokrýva od vrcholu roztoku po spodok skúmavky; je zrejmé, že pre stály objem bude výška stĺpca v skúmavke závisieť od štvorca polomeru skúmavky.

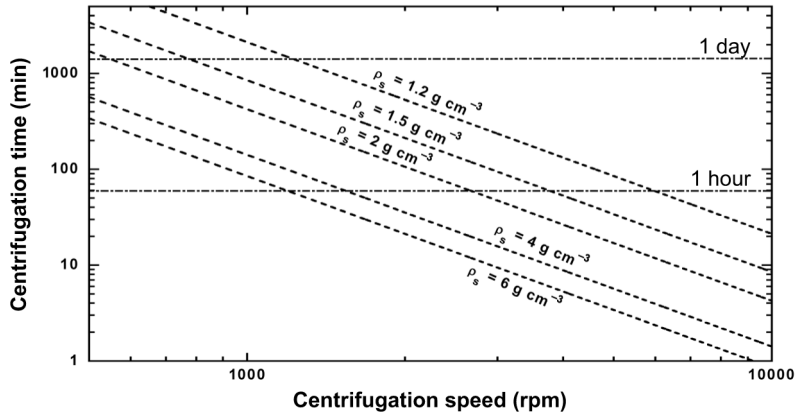
4. Obr. 1 predstavuje variácie v čase odstreďovania t) verzus rýchlosť (rpm) pri rôznych hodnotách mernej hmotnosti pôdy (p_s) (obr. la) a rôzne výšky stĺpcov zmesí v odstreďovacej skúmavke (obr. 2a). Z obr. la je vidieť, že vplyv mernej hmotnosti pôdy sa stáva očividným; napr. pri klasickom odstreďovaní pri 3000 otáčkach/min. je čas odstreďovania približne 240 min. pri mernej hmotnosti pôdy 1,2 g cm^3, zatiaľ čo pri mernej hmotnosti pôdy rovnajúcej sa 2,0 g cm^3 je to iba 50 min. Podobne (obr. lb) pri klasickom odstreďovaní pri 3000 otáčkach/min. je čas odstreďovania približne 50 min. pri výške stĺpca zmesi 10 cm a iba 7 min. pri výške stĺpca 1 cm. Je však dôležité nájsť optimálny vzťah medzi odstreďovaním, ktoré vyžaduje najmenšiu možnú výšku stĺpca a ľahkou manipuláciou pre experimentátora pri oddeľovaní fáz po odstreďovaní.

▼B

5. Okrem toho, pri definovaní experimentálnych podmienok na separáciu fáz pôdy a roztoku je dôležité vziať do úvahy možnú existenciu tretej „pseudofázy“ koloidov. Tieto častice, s veľkosťou menšou ako 0,2 μm môžu mať významný vplyv na celý mechanizmus adsorpcie látky v pôdnej suspenzii. Po ukončení odstreďovania, ako je popísané vyššie, koloidy zostávajú vo vodnej fáze a sú podrobené analýze spolu s vodnom fázou. Takto sa stratí informácia o ich vplyve.

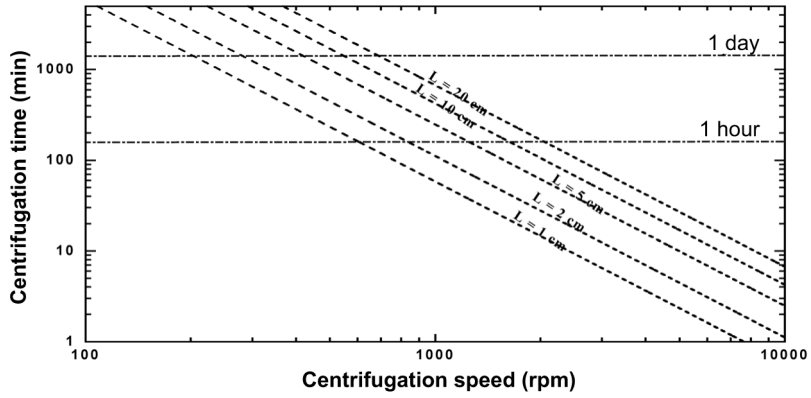
   Ak má riadiace laboratórium veľkú odstredivku alebo možnosť ultrafiltrácie, adsorpcia/desorpcia látky vo vode sa dá preskúmať do väčšej hĺbky vrátane informácií o adsorpcii látky na koloidoch. V tomto prípade sa ultraodstredivka nastaví na 60 000 otáčok/min alebo sa použije ultrafiltrácia s filtrom o porozite/veľkosť pórov/100 000 daltonov, aby sa oddelili tri fázy – pôda, koloidy, roztok. Podľa toho sa upraví aj protokol o výsledkoch testu, aby sa všetky tri fázy stali súčasťou analýzy.

Obr. 1a



Variácie času odstreďovania (t) verzus rýchlosť odstreďovania (rpm) na rôzne merné hmotnosti pôdy (ρ_s). R_t = 10 cm, R_b – R_t = 10 cm, η = 8,95 × 10-^{3} g s-^{1} cm-^{1}a ρ_{aq} = 1,0 g.cm-^{3} pri 25 °C.

Obr. 1b



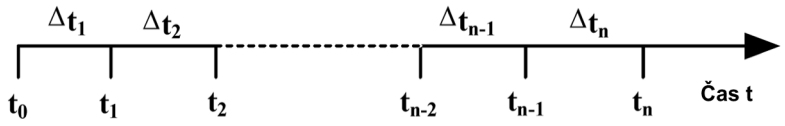
Variácie času odstreďovania (t) verzus rýchlosť odstreďovania (rpm) na rôzne výšky stĺpca zmesi v odstreďovacej skúmavke (R_b – R_t)= L; R_t = 10 cm; η = 0,89 × 10-^{3} g s-^{1} cm-^{1}, ρ_{aq} = 1,0 g.cm-^{3} pri 25 °C a ρ_s = 2,0 g cm-^{3}.

▼B

DODATOK 5

VÝPOČET ADSORPCIE A (%) A DESORPCIE D (%)

Časová schéma postupu je:



Pri všetkých výpočtoch sa predpokladá, že testovaná látka je stabilná a vo väčšej miere sa neadsorbuje na stenách nádoby.

ADSORPCIA A (A %)

a) *Paralelná metóda*

Percento adsorpcie sa vypočíta na každú testovanú skúmavku (i) v každom časovom bode (t_i) podľa rovnice:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads}(t_i) \cdot 100}{m_0} \ (\%) \qquad (1)$$

Členy tejto rovnice sa dajú vypočítať takto:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (2)$$

$$m_s^{ads}(t_i) = m_0 - C_{aq}^{ads}(t_i) \cdot V_0 \ (\mu g) \qquad (3)$$

kde:

A_{t_i} = percento adsorpcie [%] v časovom bode t_i;

$m_s^{ads}(t_i)$ = hmotnosť testovanej látky v pôde v čase t_i, analýza je (µg);

m_o = hmotnosť testovanej látky v testovanej skúmavke na začiatku testu (µg);

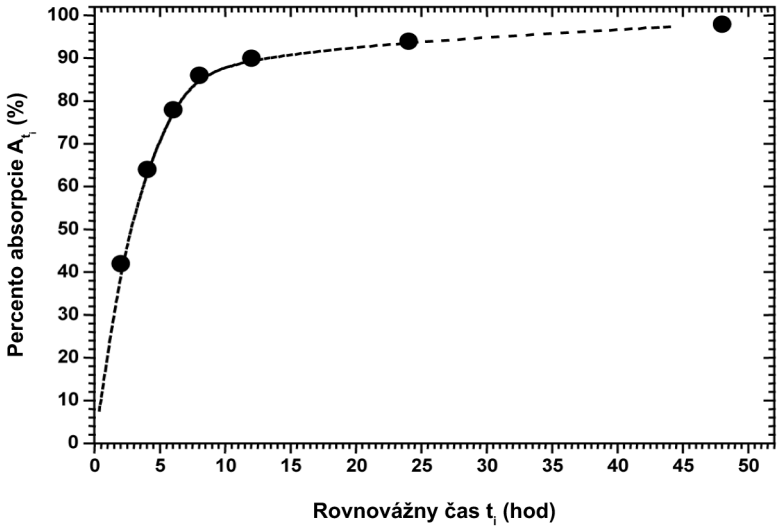
C_o = počiatočná hmotnostná koncentrácia testovaného roztoku, ktorý je v kontakte s pôdou (ug cm^{-3});

▼B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = hmotnostná koncentrácia látky vo vodnej fáze v čase t_i, analýza je ukončená (µg cm^{-3}); táto koncentrácia sa stanovuje analyticky tak, že sa vezmú do úvahy hodnoty uvedené zo slepých pokusov

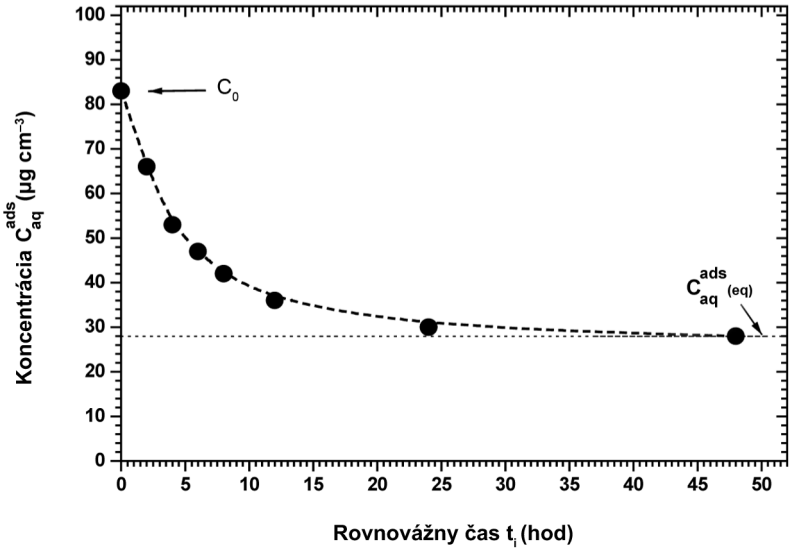
V_o = počiatočný objem testovaného roztoku, ktorý je v kontakte s pôdou (cm^3).

Hodnoty percenta adsopcie A_{t_i} alebo $C_{aq}^{ads}(t_i)$sú zobrazené verzus čas a čas, po ktorom sa dosiahne sorpčná rovnováha, je stanovený. Príklady takýchto grafov sú uvedené v obr. 1 a 2.



Obr. 1

Graf adsorpčnej rovnováhy



Obr. 2

Závislosť hmotnostnej koncentrácie testovanej látky vo vodnej fáze (C_{aq}) od času

▼B

b) *Sériová metóda*

Pri nasledujúcich rovniciach platí, že adsorpčná metóda sa vykonáva meraním testovanej látky v malých alikvotných častiach vodnej fázy za určitých časových intervalov.

— množstvo látky adsorbovanej na pôde počas každého časového intervalu sa vypočíta nasledovne:

— pre prvý časový interval $\Delta t_1 = t_1 - t_o$

$$m_s^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) \quad (4)$$

— pre druhý časový interval $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{ads}(\Delta t_2) = m_m^{ads}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (5)$$

— pre tretí časový interval $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{ads}(\Delta t_3) = m_m^{ads}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (6)$$

— pre tretí časový interval $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{ads}(\Delta t_n) = m_m^{ads}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{ads}(t_n) \cdot \left(\frac{\left(V_0 - (n-1) \cdot v_a^A \right)}{v_a^A} \right) \quad (7)$$

— percento adsorpcie v každom časovom intervale $A_{\Delta t_i}$ sa vypočíta podľa nasledujúcej

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{ads}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (8)$$

pričom percento adsorpcie A_{t_i} v časovom bode t_i je dané vyššie uvedenou rovnicou:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t^i} m_s^{ads}(j)}{m_0} \cdot 100\ (\%) \quad (9)$$

Hodnoty percenta adsorpcie A_{t_i} alebo $A_{\Delta t_i}$ (s ohľadom na potreby štúdie) sú zaznamenané oproti času a čas, po ktorom sa dosiahla sorpčná rovnováha, je stanovený.

— V rovnovážnom čase t_{eq}:

— hmotnosť testovanej látky adsorbovanej na pôde je:

$$m_s^{ads}(eq) = \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)$$

▼B

— hmotnosť testovanej látky v roztoku je:

$$m_{aq}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta t_i = 1}^{n} m_s^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— percento adsorpcie v rovnováhe je:

$$A_{eq} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (12)$$

Vyššie uvedené parametre sa definujú ako:

$m_s^{ads}(\Delta t_1), m_s^{ads}(\Delta t_2), ..., m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = hmotnosť látky adsorbovanej na pôde v časových intervaloch Δ_{t1}, Δ_{t2},..., Δ_{tn} jednotlivo (μg);

$m_s^{ads}(\Delta t_1), m_s^{ads}(\Delta t_2), ..., m_s^{ads}(\Delta t_n)$ = hmotnosť látky meraná v alikvótnych častiach $v_a{}^A v$ časových bodoch t_1, t_2, t_n jednotlivo (μg);

$m_s^{ads}(eq)$ = hmotnosť látky adsorbovanej na pôde v čase adsorpčnej rovnováhy (μg);

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = hmotnosť látky v roztoku v čase adsorpčnej rovnováhy (μg);

v_a^A = objem alikvotnej časti, v ktorej je testovaná látka meraná (cm^3);

$A_{\Delta t_i}$ = precento adsorpcie zodpovedajúce časovému intervalu Δt_i (%);

A_{eq} = precento adsorpcie v čase adsorpčnej rovnováhy (%).

DESORPCIA D (%)

Čas t_o, v ktorom začína experiment na určenie desorpčnej kinetiky, sa považuje ten moment, v ktorom je nahradený maximálny objem roztoku testovanej látky rovnakým objemom roztoku 0,01 M $CaCl_2$.

a) *Paralelná metóda*

V časovom bode t_i sa hmotnosť testovanej látky meria vo vodnej fáze vybratej zo skúmavky i (V^i_r) a desorbovaná hmotnosť sa vypočíta podľa vzorca:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{v_r^i} \right) - m_{aq}^A \quad (13)$$

Pri desorpčnej rovnováhe platí, že $t_i = t_{eq}$, a teda $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

Hmotnosť testovanej látky desorbovanej počas intervalu (Δt_i) je daná rovnicou:

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i=1} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

Percento desorpcie sa vypočíta:

v časovom bode t_i podľa rovnice:

▼B

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (15)$$

v časovom intervale (Δt_i) podľa rovnice:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (16)$$

kde:

D_{t_i} = percento desorpcie v časovom bode t_i (%);

$D_{\Delta t_i}$ = percento desorpcie zodpovedajúce časovému intervalu Δt_i (%);

$m_{aq}^{des}(t_1)$ = hmotnosť testovanej látky desorbovanej v časovom bode t_i (μg);

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$ = hmotnosť látky desorbovanej na pôde v časovom intervale Δt_i (μg);

$m_m^{des}(t_i)$ = analyticky stanovená hmotnosť testovanej látky nameraná v časovom bode t_i a v roztoku V_r^i, ktorý bol analyzovaný (μg);

m_{aq}^{A} = hmotnosť testovanej látky, ktorá zostala z adsorpčnej rovnováhy kvôli nedokončenej substitúcii objemu (μg);

$$m_{aq}^{A} = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0}\right) \quad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = hmotnosť testovanej látky v roztoku v čase adsorpčnej rovnováhy (μg);

V_R = objem kalu odstráneného zo skúmavky po dosiahnutí adsorpčnej rovnováhy a nahradeného rovnakým objemom 0,01 M $CaCl_2$ (cm^3);

V_r^i = objem roztoku odohraného zo skúmavky i) na meranie testovanej látky v experimente desorpčnej kinetiky (cm^3).

Hodnoty desorpcie D_{t_i} alebo $D_{\Delta t_i}$ (podľa potrieb štúdie) sú zobrazené verzus čas a čas, po ktorom je dosiahnutá desorpčná rovnováha, je stanovený.

b) **Sériová metóda**

Nasledujúce rovnice zohľadňujú to, že adsorpčné postupy, ktoré predchádzali, boli uskutočnené meraním testovanej látky v malom alikvotnom objeme (v_a^A) vodnej fázy (sériová metóda v 1.9 Vykonanie testu). Predpokladá sa, že a) objem kalu odstráneného zo skúmavky po pokuse na získanie adsorpčnej kinetiky bol nahradený rovnakým objemom 0,01 M $CaCl_2$ roztoku (V_R) a b) celkový objem vodnej fázy, ktorá je v kontakte s pôdou (V_T), zostáva konštantná počas pokusu na získanie adsorpčnej kinetiky a je vyjadrená rovnicou:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \quad (18)$$

▼B

časovom bode t_i:

— hmotnosť testovanej látky meraná v malom alikvotnom objeme (v_a^D) a desorbovaná hmotnosť sa vypočítajú podľa rovnice:

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (i-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) \quad (19)$$

— v desorpčvnej rovnováhy $t_i = t_{eq}$ a preto $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$.

— percento desorpcie D_{t_i} sa vypočíta podľa nasledujúcej rovnice:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (20)$$

V časovom intervale pre tretí časový interval (Δt_i):

— pre prvý časový interval $\Delta t_i = t_i - t_o$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \text{ and } m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— pre druhý časový interval $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) = m_m^{des}(t_2) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - v_a^D\right)}{V_T}\right)$$

and

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{ads}(eq) - \left[m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)\right] \quad (22)$$

— pre n-tý časový interval $\Delta t_n = t_{n\ -}\ t_{n-1}$

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) = \left[m_m^{des}(t_n) \cdot \left(\frac{V_T}{v_a^D}\right) - m_{aq}^A \cdot \left(\frac{\left(V_T - (n-1) \cdot v_a^D\right)}{V_T}\right) - \sum_{i=1,\, n \neq 1}^{n-1} \left(\frac{\left(V_T - (n-i) \cdot v_a^D\right)}{V_T} \cdot m_{aq}^{des}(\Delta t_i)\right)\right]$$

and

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{ads}(eq) - \sum_{i=1,\, n \neq 1}^{n} m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \quad (23)$$

Nakoniec, percento desorpcie v každom časovom intervale $D_{\Delta t_i}$ sa vypočíta pomocou nasledujúcej rovnice:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(\Delta t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (24)$$

zatiaľ čo percento desorpcie D_{t_i} v každom časovom bode t_i je dané rovnicou:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100\ (\%) \quad (25)$$

▼B

kde sú vyššie uvedené parametre definované nasledovne:

$m_s^{des}(\Delta t_1)$, $m_s^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_s^{des}(\Delta t_n)$ = hmotnosť látky, ktorá zostáva absorbovaná na pôde po časových intervaloch Δt_1, Δt_2 ..., Δt_n jednotlivo (μg);

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1)$, $m_{aq}^{des}(\Delta t_2)$,... , $m_{aq}^{des}(\Delta t_n)$ = hmotnosť testovanej desorbovanej látky počas časových intervalov Δt_1, Δt_2 ..., Δt_n jednotlivo (μg);

$m_m^{des}(t_1)$, $m_m^{des}(t_2)$,... , $m_m^{des}(t_n)$ = hmotnosť látky meranej v alikvótnej časti (v_a^D) v časovom bode Δt_1, Δt_2 ..., Δt_n jednotlivo (μg);

V_T = celkový objem vodnej fázy v kontakte s pôdou počas pokusu na získanie desorpčnej kinetiky vykonaného sériovou metódou (cm^3);

m_{aq}^A = hmotnosť látky, ktorá zostala z adsorpčnej rovnováhy kvôli neukončenej substitúcii objemu (μg);

$$m_{aq}^A = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^{n} v_a^A(i) \right)} \right) \cdot m_{aq}^{ads}(eq) \qquad (26)$$

V_R = objem kalu odstráneného zo skúmavky po dosiahnutí adsorpčnej rovnováhy a nahradeného rovnakým objemom 0,01 M $CaCl_2$ solution (cm^3);

v_a^D = objem alikvotnej časti odobratej na analytické použitie zo skúmavky (i) počas pokusu na zistenie desorpčnej kinetiky vykonaného sériovou metódou (cm^3);

$$v_a^D \leq 0,02 \cdot V_T \qquad (27)$$

▼B

DODATOK 6

ADSORPCIA – DESORPCIA V PÔDE: PREHĽAD ÚDAJOV

Testovaná látka:

Testovaná pôda:

Hmotnostný obsah suchej pôdy (105 °C, 12h): ..... %

Teplota: ..... °C

Vhodnosť analytickej metódy

Odvážená pôda	g	
Hmotnosť suchej pôdy	g	
Objem roztoku $CaCl_2$	cm^3	
Menovitá koncentrácia finálneho roztoku	$\mu g\ cm^{-3}$	
Analytická koncentrácia finálneho roztoku	$\mu g\ cm^{-3}$	

Princíp použitej analytickej metódy:

Kalibrácia použitej analytickej metódy:

Testovaná látka:

Testovaná pôda:

Hmotnostný obsah suchej pôdy (105 °C, 12 h): ..... %

Teplota: ..... °C

Druh analytickej metodológie: nepriam ☐ paralelná ☐ sériová ☐ priama ☐

Adsorpčný test: testované vzorky

	Symbol	Jednotky	Rovnovážny cas		Rovnovážny čas		Rovnovážny čas		Rovnovážny čas	
Skúmavka č.										
Odvážená pôda	—	g								
Pôda: suchá hmotnosť	$m_{pôda}$	g								
Objem vody v odváženej vode (vypočítany)	V_{ws}	cm^3								
Objem 0,01 M $CaCl_2$ roztoku v rovnovážnej pôde		cm^3								
Objem zásobného roztoku		cm^3								
Celkový objem vodnej fázy v kontakte s pôdou	V_0	cm^3								
Počiatočná koncentrácia testovaného roztoku	C_0	$\mu g\ cm^3$								
Hmotnosť testovanej látky na začiatku testu	m_0	µg								

▼B

	Symbol	Jednotky	Rovnovážny cas		Rovnovážny čas		Rovnovážny čas		Rovnovážny čas	
Po vytrepávaní a odstred'ovaní										
NEPRIAMA METÓDA										
Paralelná metóda										
Koncentrácia testovanej látky, vodná fáza, korekcia slepých pokusov	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	µg cm^{-3}								
Sériová metóda										
Nameraná hmotnosť testovanej látky v alikvotnom objeme V_a^A	$m_m^{ads}(t_i)$	µg								
PRIAMA METÓDA										
Hmotnosť testovanej látky adsorbovanej na pôde	$m_s^{ads}(t_i)$	µg								
Vypočet adsorpcie										
Adsorpcia	A_{t_i}	%								
	$A_{\Delta t_i}$	%								
Hodnoty										
Koeficient adsorpcie	K_d	cm^3 g^{-1}								
Hodnoty										
Koeficient adsorpcie	K_{oc}	cm^3 g^{-1}								
Hodnoty										

Testovaná látka:

Testovaná pôda:

Hmotnostný obsah suchej pôdy (105 °C, 12 h): ..... %

Teplota: ..... °C

Test adsorpcie: slepé pokusy a kontrola

	Symbol	Jednotky	Slepý pokus		Slepý pokus		Kontrola	
Skúmavka č.								
Hmotnosť pôdy		g					0	0
Množstvo vody v odváženej pôde (vypočítané)		cm^3					—	—
Objem 0,01 M $CaCl_2$ pridaného roztoku		cm^3						
Objem zásobného roztoku pridanej testovanej látky		cm^3	0	0				
Celkový objem vodnej fázy (vypočítaný)		cm^3					—	—

▼B

	Symbol	Jednotky	Slepý pokus		Slepý pokus		Kontrola	
Počiatočná koncentrácia testovanej látky vo vodnej faze		µg cm^{-3}						
Po vytrepávaní a odstreďovaní								
Koncentrácia vo vodnej faze		µg cm^{-3}						

Pozn. Pridajte kolónky, ak je to potrebné.

Testovaná látka:

Testovaná pôda:

Hmotnostný obsah suchej pôdy (105 °C 12 h): ..... %

Teplota: ..... °C

Hmotnostná bilancia

	Symbol	Jednotky				
Skúmavka č..						
Odvážená pôda	—	g				
Pôda: suchá hmotnosť	$m_{pôda}$	g				
Objem vody v odváženej pôde (vypočítané)	V_{WS}	ml				
Objem 0,01 M $CaCl_2$ roztoku v rovnovážnej pôde		ml				
Objem zásobného roztoku		cm^3				
Celkový objem vodnej fázy v kontakte s pôdou	V_0	cm^3				
Počiatočná koncentrácia testovaného roztoku	C_0	µg cm^{-3}				
Rovnovážny čas	—	h				
Po vytrebabaní a odstred'ovaní						
Koncentrácia testovanej látky vodná fáza, vrátane korekcie rovnováhy slepého pokusu	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}				
Rovnovážny čas	t_{eq}	h				
Prvé riedenie s rozpúšťadlom						
Nahradený objem vodnej fázy	V_{rec}	cm^3				
Pridaný objem rozpúšťadla	ΔV	cm^3				
Prvá extrakcia s rozpúšťadlom						
Signál analyzovaný v rozpúšťadle	S_{E1}	rôzne				
Koncentrácia testovanej látky v rozpúšťadle	C_{E1}	µg cm^{-3}				

▼B

	Symbol	Jednotky				
Hmotnosť látky extrahovanej z pôdy a zo stein nádoby	m_{E1}	µg				
Druhé riedenie s rozpúšťadlom						
Nahradený objem vodnej fázy	ΔV_s	cm^3				
Pridaný objem vodnej fázy	$\Delta V'$	cm^3				
Druhá extrakcia s rozpúšťadlom						
Signál analyzovaný v rozpúšťadle	S_{E2}	var.				
Koncentrácia testovanej látky v rozpúšťadle	C_{E2}	µg cm^{-3}				
Hmotnosť látky extrahovanej z pôdy a zo stein nádoby	m_{E2}	µg				
Celková hmotnosť testovanej látky extrahovanej v dvoch krokoch	m_E	µg				
Hmotnostná bilancia	MB	%				

Testovaná látka:

Testovaná pôda:

Hmotnostný obsah suchej pôdy (105 °C, 12 h): ..... %

Teplota: ..... °C

Adsorpčná izotermia

	Symbol	Jednotky								
Skúmavka č.										
Odvážená pôda	—	g								
Pôda: suchá hmotnosť	E	g								
Objem vody v odváženej pôde (vypočítané)	V_{WS}	cm^3								
Objem 0,01 M $CaCl_2$ roztoku v rovnovážnej pôde		cm^3								
Pridaný objem zásobného roztoku		cm^3								
Celkový objem vodnej fázy v kontakte s pôdou (vypočítaný)	V_0	cm^3								
Počiatočná koncentrácia testovaného roztoku	C_0	µg cm^{-3}								
Rovnovážny čas	—	h								

▼B

	Symbol	Jednotky								
Po vytrepaní a odstreďovaní										
Koncentrácia látky vodná fáza, vrátane korekcie slepého pokusu	$C_{aq}^{ads}(eq)$	µg cm^{-3}								
Teplota		°C								
Adsorpčná hmotnosť na jednotke pôdy	$C_{s}^{ads}(eq)$	µg g^{-1}								

Regresná analýza:

Hodnota K_F^{ads}:

Hodnota l/n:

Regresný koeficient r^2:

Testovaná látka:

Testovaná pôda:

Hmotnostný obsah suchej pôdy (105 °C, 12 h): ..... %

Teplota: ..... °C

Druh analytickej metodológie: nepriama ☐ paralelná ☐ sériová ☐

Desorpčný test

		Symbol	Jednotka	Časový interval	Časový interval	Časový interval	Časový interval
Skúmavka č. vystupujúca z adsorpčného testu							
Hmotnosť látky adsorbovanej na pôde v čase adsorpčnej rovnováhy		$m_s^{ads}(eq)$	µg				
Nahradený objem vodnej fázy, nahradený objem 0,01 M $CaCl_2$		V_R	cm^3				
Celkový objem vodnej fázy v kontakte s pôdou	PM	V_0	cm^3				
	SM	V_T	cm^3				
Hmotnosť testovanej látky odloženej počas adsorpčnej rovnováhy kvôli nedokončenej substitúcii objemu		m_{aq}^A	µg				

Desorpčná kinetika

Nameraná hmotnosť látky desorbovaná z pôdy v čase t_i		$m_m^{des}(t_i)$	µg				
Objem roztoku odobraný zo skúmavky i) s cieľom merania testovanej látky	PM	V_r^i	cm^3				
	SM	v_a^D	cm^3				
Hmotnosť látky desorbovanej z pôdy v čase t_i (nameraná)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	µg				
Hmotnosť látky desorbovanej z pôdy v časovom intervale Δ_{ti} (nameraná)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	µg				

▼B

	Symbol	Jednotka	Časový interval	Časový interval	Časový interval	Časový interval
Percento desorpcie						
Desorpcia v čase t_i	Dt_i	%				
Desorpcia v časovom intervale Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Zdanlivý desorpčný koeficient	K_{des}					

PM: paralelná metóda

SM: sériová metóda

▼B

C.19. **ODHAD ADSORPČNÉHO KOEFICIENTU (K_{oc}) V PÔDE A V SPLAŠKOVOM KALE ZA POUŽITIA VYSOKOÚČINNEJ KVAPALINOVEJ CHROMATOGRAFIE/HPLC/**

1. **METÓDA**

Táto metóda je totožná s metódou OECD TG121 (2001).

1.1. ÚVOD

Sorpčné správanie sa látok v pôde a splaškových kaloch môže byť opísané cez experimentálne stanovené parametre v zmysle testovacej metódy C.18. Dôležitým parametrom je adsorpčný koeficient, ktorý je definovaný ako pomer medzi koncentráciou látky v pôde/splaškoch a koncentrácie látky vo vodnej fáze pri adsorpčnej rovnováhe. Adsorpčný koeficient normalizovaný na obsah organického uhlíka v pôde K_{oc} je vhodný indikátor väzbovej kapacity chemikálií na organické látky z pôdy/splaškov a dovoľuje urobiť porovnania rôznymi chemikáliami. Tento parameter môže byť odhadnutý cez korelácie s rozpustnosťou vo vode a n-oktanol/voda rozdeľovacím koeficientom (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7).

Experimentálna metóda opísaná v tomto teste používa vysokoúčinnú kvapalinovú chromatografiu/HPLC/na odhadnutie adsorpčného koeficientu K_{oc} v pôde a splaškových kaloch (8). Odhady sú vyššej spoľahlivosti ako tie z QSAR výpočtov (9). Metóda odhadov nemôže úplne nahradiť série rovnovážnych experimentov používaných v testovacej metóde C.18. Avšak odhadnutý K_{oc} môže byť osožný pri vyberaní vhodných parametrov testu na štúdie adsorpcie/-desorpcie podľa testovacej metódy C.18 vypočítaním K_d (distribučný koeficient) alebo K_f (Freundlichov adsorpčný koeficient) podľa rovnice 3 (pozri sekciu 1.2).

1.2. DEFINÍCIE

K_d: Distribučný koeficient je definovaný ako pomer rovnovážnej koncentrácie C rozpustenej testovacej látky v dvojfázovom systéme pozostávajúcom zo sorbentu/pôda alebo splaškové kaly/a pôdnej fázy; je to bezrozmerná veličina, keď koncentrácie v obidvoch fázach sú vyjadrené na základe hmotnosť/hmotnosť. V prípade koncentrácie vo vodnej fáze je daná na základe hmotnosť/objem, potom jednotky sú $ml.g^{-1}$.K_d sa môže meniť s vlastnosťou sorbentu a môže byť závislé od koncentrácie.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} or \frac{C_{sludge}}{C_{aq}} \quad (1)$$

kde:

$C_{pôda}$ = koncentrácia testovacej látky v pôde pri rovnováhe ($\mu g .g^{-1}$)

C_{kal} = koncentrácia testovacej látky v kale pri rovnováhe ($\mu g .g^{-1}$)

C_{aq} = koncentrácia testovacej látky vo vodnej fáze pri rovnováhe ($\mu g.g^{-1}$, $\mu g .ml^{-1}$)

▼B

K_f: Freundlichov adsorpčný koeficient je definovaný ako koncentrácia testovacej látky v pôde alebo splaškovom kale (x/m), keď rovnovážna koncentrácia C_{aq} vo vodnej fáze je rovná 1; jednotky sú µg.g^{-1} sorbent. Hodnota sa môže meniť s vlastnosťami sorbentu.

$$\log\frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n}\cdot\log C_{aq} \quad (1)$$

kde:

x/m = množstvo testovacej látky x (µg) adsorbovanie na množstve sorbentu m (g) pri rovnováhe

l/n = nábeh Freundlichovej adsorpčnej izotermy

C_{aq} = koncentrácia testovacej látky vo vodnej fáze pri rovnováhe (µg.ml^{-1})

$$\text{At}C_{aq} = 1; \log K_f = \log\frac{x}{m}$$

K_{oc}: Distribučný koeficient (K_d) alebo Freundlichov adsorpčný koeficient (K_f) normalizovaný na obsah organického uhlíka (f_{oc}) v sorbente, predovšetkým na neionizované chemikálie, je to vhodný indikátor na stupeň adsorpcie medzi látkou a sorbentom a umožňuje urobiť porovnania medzi rôznymi chemikáliami. V závislosti od rozmeru/jednotiek, v ktorých sú udávané (K_d a K_f, K_{oc}) môže byť bezrozmerný alebo mať jednotku (ml.g^{-1}) alebo (µg .g^{-1}) organickej látky.

$$K_{oc} = \frac{K_d}{f_{oc}}\left(\text{bezrozmzrný alebo ml}\cdot g^{-1}\right) \text{ alebo } \frac{K_f}{f_{oc}}\left(\mu g\cdot g^{-1}\right) \quad (3)$$

Vzťah medzi K_{oc} a K_d nie je vždy lineárny a preto K_{oc} hodnota sa môže meniť z pôdy na pôdu, ale ich variabilita je značne redukovaná porovnaním K_d alebo K_f hodnôt.

Adsorpčný koeficient (K_{oc}) je odvodený z kapacitného faktora (k") využívajúceho kalibračnú závislosť log k' versus log K_{oc} na vybraté referenčné zlúčeniny.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

kde:

t_R = HPLC retenčný čas testovacej a referenčnej látky (minúty)

t_o = HPLC mŕtvy čas (minúty) (pozri odsek 1.8.2)

P_{ow}: Rozdeľovaci koeficient na systém oktanol – voda je definovaný ako pomer koncentrácií rozpustených látok v n-oktanole a vo vode – je to bezrozmerná hodnota.

$$\text{Pow} = \frac{\text{Coctanol}}{\text{Caq}} (= \text{Kow}) \quad (5)$$

1.3. REFERENČNÉ LATKY

Štruktúrny vzorec, čistota a disociačná konštanta látok (ak je to vhodné) by mali byť známe pred použitím metódy. Informácia o rozpustnosti vo vode a v organických rozpúšťadlách, o rozdeľovacom koeficiente na systém oktanol – voda a hydrolyzačné charakteristiky sú vhodné.

▼B

Aby sme priviedli do vzájomného vzťahu FTPLC – retenčné údaje testovacej látky s jeho adsorpčným koeficientom, K_{oc}, bol stanovený kalibračný graf ako log K_{oc} = f (log k'). Mal by byť zostrojený minimálne so šiestich referenčných bodov, najmenej jeden bod nad a jeden pod očakávanou hodnotou na testovaciu látku. Presnosť metódy sa značne zlepší, ak sa použijú referenčné látky, ktorých štruktúra je príbuzná testovacej látke, štruktúre. Ak nie sú tieto údaje dostupné, potom je na užívateľovi, ktorý musí vybrať vhodné kalibračné látky. V tomto prípade bol vybraný obvyklejší set štruktúrovo heterogénnych látok. Látky a hodnoty K_{oc}, ktoré môžu byť použité, sú vypísané v dodatku v tabuľke 1 pre splaškové kaly a v tabuľke 3 pre pôdu. Výber iných kalibračných látok by mal byť opodstatnený.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

FTPLC je vykonávaná na analytických kolónach naplnených s komerčne dostupnou tuhou fázou kyanopropylom obsahujúcou lipofilické a pólové podiely. Je používaná mierne pólová stacionárna fáza zakotvená na kremičitanovej matrici.

– O – Si	– CH_2 – CH_2 – CH_2	– CN
silica	nepólová zložka	pólová skupina

Princíp testovacej metódy je podobný testovacej metóde A.8 (rozdeľovaci koeficient, FTPLC metóda). Zatiaľ čo v tom čase prechádza cez kolónu spolu s mobilnou fázou, testovacia látka je interaktívna so stacionárnou fázou. Dvojité zloženie stacionárnej fázy, ktorá má polárny aj nepolárny charakter, umožňuje interakcie pólových aj nepólových skupín v molekule podobnou cestou ako v prípade organickej látky v pôdach alebo v splaškovo kalových matriciach. Toto umožňuje utvoriť vzťah medzi retenčným časom na kolóne a adsorpčným koeficientom z organickej látky.

pH má značný vplyv na sorpčné správanie sa predovšetkým na pólové látky. Pre poľnohospodársku pôdu alebo nádrže čistiarní odpadových vôd pH sa normálne mení pH v rozmedzí pH = 5,5 – 7,5. Pre ionizovateľné látky by mali byť vykonané dva testy s obidvoma, ionizovanou a neionizovanou formou, vo vhodnom tlmiacom roztoku, ale iba v prípade, keď najmenej 10 % testovacej zlúčeniny bude disociované v rozmedzí pH od 5,5 do 7,5.

Odkedy sa využíva na vyhodnotenie len vzťah medzi retenciou na HPLC kolóne a adsorpčným koeficientom, nevyžaduje sa žiadna kvalitatívna analytická metóda a je potrebné iba stanovenie retenčného času. Ak je dostupný vhodný set referenčných látok a môžu byť použité štandardné experimentálne podmienky, metóda poskytuje rýchlu a účinnú cestu na odhad adsorpčného koeficientu K_{oc}.

1.5. APLIKOVATEĽNOST TESTU

HPLC metóda je aplikovateľná na chemické látky (neoznačené alebo označené), pre ktoré je dostupný vhodný detekčný systém (napr. spektrofotometer, radiačný detektor (a ktoré sú dostatočne stabilné počas trvania experimentu. Môže byť hlavne použitá na chemikálie, ktoré môžeme ťažko študovať pomocou iných experimentálnych systémov (napr. prchavé látky, ktoré nie sú rozpustné vo vode v koncentráciách, ktoré môžu byť merané analyticky. Látky s vysokou afinitou voči povrchu inkubačných systémov). Metóda môže byť použitá pri zmesiach, ktoré dávajú nerozlíšené elučné skupiny. V takomto prípade najvyšší a najnižší limit na hodnotu log K_{oc} pre zlúčeniny v zmesi by mal byť daný.

▼B

Nečistoty môžu niekedy spôsobiť problémy pri interpretácií výsledkov z HPLC, ale majú iba malý význam, ak testovacia látka je jednoznačne analyticky identifikovaná a oddelená od nečistôt.

Metóda je platná na látky v tabuľke 1 v dodatku a bola tiež aplikovaná na rôzne iné chemické látky prislúchajúce do nasledujúcich chemických skupín:

— aromatické amíny (napr. trifluralín, 4-chlóranilín, 3,5-dinitroanilín, 4-metylanilín, N-metylanilín, 1-naftylamín),

— estery aromatických karboxylových kyselín (napr. metylester kyseliny benzoovej, etylester kyseliny 3,5-dinitrobenzovej),

— aromatické uhľovodíky/napr. toluén, xylén, etylbenzén, nitrobenzén,

— estery aryloxyfenoxy propionóvej kyseliny (napr. diclofop-metyl, fenoxaprop-etyl, fenoxaprop-P-etyl),

— benzimidazol a imidazolové fungicídy (napr. carbendozim, fuberidazol, trianoxid),

— amidy karboxylových kyselín (napr. 2-chlórbenzamid, N,N-dimetylbenzamid, 3,5-dinitrobenzamid, N-metylbenzamid, 2-nitrobenzamid, 3-nitrobenzamid),

— chlórované uhľovodíky (napr. endosulfan, DDT, hexachlórbenzén, chintozén, 1,2,3-trichlórbenzén),

— organofosforečné insekticídy (napr. azinofos-metyl, disulfoton, fenamiphos, izofenfs, pyra-zofos, sulprofos, triazofos),

— fenoly (napr. fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, pentachlórofenol, 2,4,6-trichlórfenol, 1-naftol),

— deriváty fenylmočoviny (napr. izoproturon, monolinuron, pencycuron),

— pigmenty farbív (napr. Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81)

— polyaromatické uhľovodíky (napr. acenaftén, naftalén),

— 1,3,5-trianzínové herbicídy (napr. prometrín, propazin, simazín, terbutrín),

— triazolové deriváty (napr. tebucanozol, triadimefon, tradimenol, triapentenol).

Táto metóda nie je použiteľná na látky, ktoré reagujú s hociktorým z eluentov alebo so stacionárnou fázou. Tiež nie je aplikovateľná na látky, ktoré reagujú špecifickým spôsobom s anorganickými zložkami (napr. formácia klastrových komplexov s ílovými minerálmi). Metóda nemusí fungovať na povrchovo aktívne látky, anorganické zlúčeniny a slabé alebo silné organické kyseliny a zásady. Hodnota log K_{oc} môže byť stanovená v rozmedzí od 1,5 do 5,0. Ionizovateľné látky musia byť merané za použitia tlmiacej mobilnej fázy, ale treba dbať, aby sa zabránilo zvážaniu tlmiacich zložiek roztoku alebo testovanej látky.

▼B

1.6. KRITÉRIÁ KVALITY

1.6.1. **Presnosť**

Obvykle môže byť adsorpčný koeficient testovacej látky odhadnutý v medziach ± 0,5 log jednotky hodnoty, stanovenej sériou rovnovážnej metódy (pozri tabuľka 1 v dodatku). Vyššia presnosť môže byť dosiahnutá, ak sú použité referenčné látky s podobnou štruktúrou ako testovacia látka.

1.6.2. **Opakovateľnosť**

Stanovenie by sa malo vykonať najmenej dvakrát. Hodnoty log K_{oc} odvodené z jednotlivých meraní by mali byť v rozmedzí 0,25 log jednotky.

1.6.3. **Reprodukovateľnosť**

Doteraz nadobudnutá skúsenosť v používaní metódy potvrdzuje jej platnosť. Overovanie HPLC metódy, pri ktorej bolo použitých 48 látok (väčšinou pesticídov), na ktoré boli spoľahlivé dáta K_{oc} v pôdach dostupné, získal sa korelačný koeficient R = 0,95 (10), (11).

Vykonal sa vnútrolaboratórny porovnávací test s 11 účastníckymi laboratóriami, aby sa zdokonalila validová metóda. Výsledky sú uvedené v tabuľke 2 v dodatku.

1.7. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.7.1. **Predbežný odhad adsorpčného koeficientu**

Rozdeľovači koeficient na systém oktanol/voda P_{ow} (= K_{ow}) a v určitej miere rozpustnosť vo vode môže byť použitý ako indikátor stupňa adsorpcie, predovšetkým pre neionizovateľné látky, a preto môže byť použitý na predbežné hľadanie rozsahu vhodných korelácií. Množstvo vhodných korelácií bolo publikovaných na niekoľko rôznych skupín chemikálií (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7).

1.7.2. **Zariadenie**

Vyžaduje sa kvapalinový chromatograf vybavený bezpulzovou pumpou a vhodným detekčným zariadením. Odporúča sa použitie dávkovacieho ventilu s dávkovacou slučkou. Môže byť použitá komerčná kyanopropylová chemicky viazaná silica na kremičitanovom základe (napr. Hypersil a Zorbax KN). Medzi injekčný/dávkovací/systém a analytickú kolónu môže byť umiestnená ochranná kolóna (predkolóna) z rovnakého materiálu ako analytická kolóna. Kolóny od rôznych dodávateľov sa môžu významne líšiť v ich separačnej účinnosti. Ako príklad – nasledujúci kapacitný faktor k'sa dosiahne: log k' > 0,0 pre log K_{oc} = 3,0 a log k' > - 0,4 pre log K_{oc} = 2,0. Ak použijeme ako mobilnú fázu metanol/voda v pomere 55 ku 45 %.

1.7.3. **Mobilné fázy**

Bolo testovaných niekoľko mobilných fáz a nasledujúce dve sú odporúčané:

— metanol/voda (55/45 % objemových),

— metanol/0,01 M citrátový tlmivý roztok pH = 6,0 (55/45 % objemových).

▼B

Metanol, destilovaná voda alebo citrátový tlmivý roztok – stupne pre HPLC sa používajú na prípravu elučného rozpúšťadla. Zmes je pred použitím odplynená. Použije sa izokratické eluovanie. Ak zmesi etanol/voda nie sú vhodné, môžeme odskúšať iné zmesi organická látka/voda, napr. etanol/voda alebo acetonitril/voda. Pre iónové zlúčeniny sa odporúča používať tlmiace roztoky, aby sa stabilizovalo pH roztoku. Pozor treba dávať, aby sme sa vyhli vyzrážaniu soli alebo znečisteniu kolóny, čo sa môže vyskytnúť pri niektorých zmesiach organická fáza/tlmivý roztok.

Nemôžu byť používané žiadne aditíva, pretože môžu ovplyvniť sorpčné vlastnosti stacionárnej fázy, takže zmeny stacionárnej fázy môžu byť ireverzibilné. Z tohto dôvodu je dané, že experimenty, v ktorých sa používajú aditíva, sa vykonávajú na separátnych kolónach.

1.7.4. **Rozpúšťadlá**

Testovacie a referenčné látky by mali byť nerozpustné v mobilnej fáze.

1.8. VYKONANIE TESTU

1.8.1 **Podmienky testu**

Teplota počas merania by mala byť zapisovaná. Veľmi odporúčame používať oddelene kolónu s kontrolovanou teplotou, aby sa zistili konštantné podmienky počas kalibrácie, chodu na odhad a merania testovacej látky.

1.8.2. **Stanovenie mŕtveho času to**

Na stanovenie mŕtveho času t_o môžu byť použité dve rôzne metódy (pozri odsek 1.2).

1.8.2.1. *Stanovenie mŕtveho času to v zmysle homologického radu.*

Tento postup bol preverený, aby poskytoval spoľahlivú a štandardizovanú hodnotu t_o – mŕtveho času. Podrobne pozri testovaciu metódu A.8: rozdeľovací koeficient (n-oktanol/voda), HPLC metóda.

1.8.2.2. *Stanovenie mŕtveho času pomocou inertnej látky, ktorá nie je zadržiavaná na kolóne.*

Táto technika je založená na nastreknutí roztoku formamidu, močoviny alebo dusičňanu sodného. Meranie je potrebné vykonať najmenej dvakrát.

1.8.3. **Stanovenie retenčného času tR**

Retenčné látky by mali byť vybraté ako bolo popísané v odseku 1.3. Môžu byť nadávkované ako zmiešané štandardy na stanovenie ich retenčných časov. Bolo potvrdené, že retenčný čas každého referenčného štandardu je neovplyvnený prítomnosťou iných referenčných štandardov. Kalibrácia by sa mala vykonávať v pravidelných intervaloch najmenej dvakrát denne, aby sme vysvetlili neočakávané zmeny v účinnosti kolóny. Kalibrácia – nadávkovanie kalibračnej zmesi. Kalibračnú zmes by sme mali nadávkovať pred a po dávkovaní testovacej látky, aby sme si potvrdili, že retenčné časy sa neposúvajú. Testovacie látky sa dávkujú osobitne v množstve tak malom ako je to možné, aby sme sa vyhli preťaženiu kolóny a stanovia sa retenčné časy.

▼B

Aby sme zvýšili spoľahlivosť merania, stanovenie by malo byť vykonané najmenej dvakrát. Hodnota log K_{oc} získaná z jednotlivých meraní by mala spadať do rozmedzia 0,25 log jednotky.

1.8.4. **Vyhodnotenie**

Kapacitné faktory k' sú vypočítané z mŕtveho času to a retenčných časov t_R vybraných referenčných látok podľa rovnice 4/pozri odsek 12/. log k' údaje referenčných látok sú uvedené oproti ich log K_{oc} hodnotám na sériu rovnovážnych pokusov/experimentov/daných v tabuľke 1 a 3 v dodatku. Využívajúc tento graf je hodnota log k' testovacej látky potom použitá na stanovenie jeho hodnoty log K_{oc}. Ak aktuálne výsledky ukazujú, že log K_{oc} testovacej látky je mimo kalibračný rozsah, test by sa mal zopakovať s použitím inej vhodnej testovacej látky.

2. **ÚDAJE A SPRÁVA**

Správa musí zahŕňať nasledujúce informácie:

— identitu testovacích alebo referenčných látok a ich čistotu, hodnotu pKa, ak je relevantná,

— opis zariadenia a pracovné podmienky, napr. typ a rozmery analytickej predkolóny, spôsob detekcie, mobilnú fázu (pomer zložiek a pH), rozsah teplôt počas merania,

— mŕtvy čas a metódu použitú na jeho stanovenie,

— množstvá testovacích a referenčných látok vstupujúcich do kolóny,

— retenčné časy referenčných zlúčenín použitých na kalibráciu,

— detaily získanej regresnej krivky (log k' vs log K_{oc}) a graf regresnej krivky,

— priemer retenčných údajov a odhad d log K_{oc} hodnoty na testovaciu zlúčeninu,

— chromatogramy.

3. **POUŽITÁ LITERATÚRA**

(1) W. J. Lyman, W. F. Reehl, D. H. Rosenblatt (ed). (1990). Handbook of chemical property estimation methods, Chap. 4, McGraw-Hill, New York.

(2) J. Hodson, N. A. Williams (1988). The estimation of the adsorption coefficient (K_{oc}) for soils by HPLC. Chemosphere, 17, 1 67.

(3) G. G. Briggs (1981). Theoretical and experimental relationships between soil adsorption, octanol-water partition coefficients, water solubilities, bioconcentration factors, and the parachor. J. Agric. Food Chem., 29, s. 1050 – 1059.

(4) C. T. Chiou, P. E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, s. 227 – 231.

(5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, s. 297 – 312.

▼B

(6) C. T. Chiou, L. J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, Science, 106, pp. 831 – 832.

(7) S. W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. Chemosphere, 10, s. 833 – 846.

(8) W. Kôrdel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), s. 121 – 128.

(9) M. Mueller, W. Kôrdel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. Chemosphere, 32(12), s. 2493 – 2504.

(10) W. Kôrdel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, Chemosphere, 27(12), s. 2341 – 2352.

(11) B. von Oepen, W. Kôrdel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, Chemosphere, 22, s. 285 – 304.

(12) W. Kôrdel, G. Kotthoff, J. Muller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), s. 1373 – 1384.

▼B

DODATOK

Tabuľka 1

Porovnanie Koc hodnôt na pôdne a splaškové kaly a vypočítané hodnoty podľa skríningovej HPLC metódy ([1]) ([2])

Látka	Číslo CAS	log K_{oc} splaškové kaly	log K_{oc} HPL C	Δ	log K_{oc} pôdy	log K_{oc} HPL C	Δ
atrazín	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
linuron	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
fention	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
monuron	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
fenantrén	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
fenyl ester kyseliny benzoovej	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
benzamid	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-nitrobenzamid	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
acetanilíd	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
anilín	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-dichlóranilín	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

([1]) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), s. 121 – 128.
([2]) W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), s. 107 – 119.

Tabuľka 2

Výsledky laboratórnych porovnávacích testov (11 zúčastnených laboratórií) vykonaných s cieľom vylepšiť a potvrdiť platnosť HPLC-metódu ([1])

Látka	Číslo CAS	log K_{oc}	K_{oc}	log K_{oc}
		[OECD 106]	[HPLC-metóda]	
atrazín	1912-24-9	1,81	78 + 16	1,89
monuron	150-68-5	1,99	100 + 8	2,00
triapentenol	77608-88-3	2,37	292 + 58	2,47
linuron	330-55-2	2,59	465 + 62	2,67
fention	55-38-9	3,31	2062 + 648	3,31

([1]) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Miiller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. Chemosphere, 30(7), s. 1373 – 1384.

▼B

Tabuľka 3

Odporúčané referenčné látky na skríningovú HPLC metódu vychádzajúcu z adsorpčných údajov na pôdu

Referenčná látka	Číslo CAS	log Koc hodnoty dávok	číslo Koc údajov	log S.D.	Zdroj
acetanilid	103-84-4	1,25	4	0,48	[a]
fenol	108-95-2	1,32	4	0,70	[a]
2-nitrob enzamid	610-15-1	1,45	3	0,90	[b]
N, N-dimetylmenzamid	611-74-5	1,52	2	0,45	[a]
4-metylbenzamid	619-55-6	1,78	3	1,76	[a]
metylbenzoan	93-58-3	1,80	4	1,08	[a]
atrazín	1912-24-9	1,81	3	1,08	[c]
isoproturon	34123-59-6	1,86	5	1,53	[c]
3-nitrobenzamid	645-09-0	1,95	3	1,31	[b]
anilín	62-53-3	2,07	4	1,73	[a]
3,5-dinitrobenzamid	121-81-3	2,31	3	1,27	[b]
carbendazim	10605-21-7	2,35	3	1,37	[c]
triadimenol	55219-65-3	2,40	3	1,85	[c]
triazooxid	72459-58-6	2,44	3	1,66	[c]
triazofos	24017-47-8	2,55	3	1,78	[c]
linuron	330-55-2	2,59	3	1,97	[c]
naftalén	91-20-3	2,75	4	2,20	[a]
endosulfan-diol	2157-19-9	3,02	5	2,29	[c]
metfiocarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	[c]
acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	[a]
1,2,3 -trichlorbenzén	87-61-6	3,16	4	1,40	[a]
γ-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	[a]
fention	55-38-9	3,31	3	2,49	[c]
priama červeň 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	[a]
pyrazofos	13457-18-6	3,65	3	2,70	[c]
α-endosulfán	959-98-8	4,09	5	3,74	[c]
diclofop-metyl	51338-27-3	4,20	3	3,77	[c]
fenantrén	85-01-8	4,09	4	3,83	[a]
basic blue 41 zmes	26850-47-5 12270-13-2	4,89	4	4,46	[a]
DDT	50-29-3	5,63	1	—	[b]

([a]) W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No. 106 01 044 (1994).
([b]) B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 22, 285-304.
([c]) Údaje poskytnuté priemyslom.

▼B

C.20. REPRODUKČNÝ TEST NA DAPHNIA MAGNA

1. METÓDA

Táto testovacia metóda reprodukčnej toxicity je totožná s metódou OECD TG 211 (1998).

1.1. ÚVOD

Prvotným cieľom testu je odhadnúť vplyv chemických látok a prípravkov na reprodukčný výstup *Daphnia magna.*

1.2. DEFINÍCIE A JEDNOTKY

Rodičovské živočíchy: sú samičky *Daphnia magna* prítomné od začiatku testu a ktorých reprodukčný výstup je objektom štúdie.

Potomstvo: sú mladé *Daphnie* vyprodukované rodičovskými živočíchmi v priebehu testu.

Najnižšia zistená účinná koncentrácia (LOEC): je najnižšia testovaná koncentrácia, pri ktorej je badateľný štatisticky významný efekt tejto látky na reprodukciu a rodičovskú mortalitu (v $p < 0,05$), keď porovnávame s kontrolou v medziach stanoveného času pôsobenia.

Koncentrácia s nezisteným vplyvom (neúčinná koncentrácia NOEC): je testovaná koncentrácia ihneď pod LOEC, ktorá je porovnávaná s kontrolnou, nemá štatisticky významný vplyv ($p < 0,05$) v rámci danej expozičnej doby.

EC_x: je koncentrácia testovanej látky rozpustenej vo vode, ktorá spôsobí x % redukciu reprodukcie *Daphnie magna* v medziach určenej expozičnej doby.

Vlastný pomer rastu: je meranie rastu populácie, ktoré zahŕňa reprodukčný výstup a mortalitu špecifickú pre istú dobu života (20), (21), (22). Pri ustálenom stave populácie je nula. Pre rastúcu populáciu to bude pozitívna hodnota a pre zmenšujúcu populáciu bude negatívna. Bezpochyby neskoršie nie je udržateľná a vedie napokon k vymretiu.

Detekčný limit: je najnižšia koncentrácia, ktorá môže byť zistená, ale nie kvantifikovaná.

Medze stanovenia: je najnižšia koncentrácia, ktorá môže byť kvantitatívne zmeraná.

Mortalita: živočích sa považuje za mŕtvy, keď sa nepohybuje, napr. keď nie je schopný plávať alebo ak nie je pozorovaný pohyb prívesov alebo podbruška do 15 sekúnd po jemnom potrasení testovacej nádobky. (Ak sa použije iná definícia, musí byť uvedená spolu s jej odkazmi.)

▼B

1.3. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Mladá samička *Daphnií,* mladšia ako 24 hodín na začiatku testu je vystavená testovacej látke pridanej do vody rôznych koncentrácií. Test trvá 21 dní. Na konci testu sa odhaduje celkový počet živého potomstva vyprodukovaného rodičovským živočíchom, ktorý prežil do konca testu, to znamená, že mláďatá vyprodukované dospelými jedincami, ktorí uhynuli počas testu, sú vylúčené z výpočtov. Reprodukčný výstup rodičovských živočíchov môže byť vyjadrený rôznymi spôsobmi (napr. počet žijúceho potomstva vyprodukovaného na živočícha za deň od prvého dňa, keď bolo spozorované potomstvo), ale okrem toho je opísaný ako celkový počet mláďat vyprodukovaný rodičovskými živočíchmi prežívajúcimi do konca testu. Reprodukčný výstup živočíchov vystavený testovacej látke je porovnávaný s kontrolnou vzorkou, aby sa stanovila najnižšia zistená účinná koncentrácia (LOEC) a teda aj nezistiteľná účinná koncentrácia (NOEC). A okrem toho, tak ako je to len možné, sú dáta analyzované za použitia regresného modelu, aby sa odhadla koncentrácia, ktorá zapríčiní x % redukciu reprodukčného výstupu (napr. EC_{50}, EC_{20} alebo. EC_{10}).

Počet prežívajúcich rodičovských živočíchov a čas prvého potomstva musí byť taktiež zaznamenaný. Taktiež iné látky s príbuzným efektom na parametre ako napr. rast (dĺžka) a možný vnútorný pomer rastu je taktiež možné otestovať.

1.4. INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LATKE

Výsledky testu akútnej toxicity (pozri metódu C.2, časť I), vykonaného na *Daphnii magne,* sú dostupné. Výsledky môžu byť užitočné pri výbere vhodných testovacích koncentrácií v reprodukčných testoch. Je potrebné poznať rozpustnosť vo vode aj tlak pár testovanej látky a mať spoľahlivú analytickú metódu na kvantifikáciu látky v testovanom roztoku so známou účinnosťou a známym detekčným limitom.

Informácie o testovanej látke, ktoré sú použité pri stanovení podmienok testu, zahŕňajú štruktúrny vzorec, svetelnú stabilitu, stabilitu pri podmienkach testu, pKa (disociačná konštanta), P_{ow} a výsledky testu na rýchlu biodegradáciu (pozri metódu C.4).

1.5. VALIDITA TESTU

Aby bol test platný, je potrebné kontrolovať nasledujúce kritériá na vykonanie testu:

— mortalita rodičovských živočíchov nemá na konci testu presiahnuť 20 % na jedného,

— významný počet živých potomkov vyprodukovaných rodičovským živočíchom prežívajúcich do konca testu je > 60.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. **Zariadenie**

Testovacia nádoba a ostatné zariadenia, ktoré prichádzajú do kontaktu s testovaným roztokom, musia byť celé vyrobené zo skla alebo z iného chemicky inertného materiálu. Testovacie nádoby sú obvykle sklenené kadičky.

Okrem toho sa vyžadujú niektoré alebo všetky nasledujúce zariadenia:

— oxygén meter (zariadenie na meranie kyslíka) mikroelektródou alebo iným vhodným zariadením merajúcim rozpustný kyslík v malých objemoch vzoriek,

▼B

— príslušné zariadenie na kontrolu teploty,

— pH-meter,

— zariadenie na meranie tvrdosti vody,

— zariadenie na stanovenie celkovej koncentrácie organického kyslíka (TOC) vo vode alebo zariadenie chemickej spotreby kyslíka (COD),

— vhodné zariadenie na kontrolovanie svetelného režimu a meranie intenzity svetla.

1.6.2. **Testované organizmy**

Druh používaný v testoch je *Daphnia magna* Straus. Môžu byť použité aj iné druhy dafnií pod podmienkou, že spĺňajú kritériá validity (kritériá validity podobné reprodukčným výstupom v kontrolnej vzorke sú významné pre druhy Dafnia.) Ak sa použijú iné druhy dafnií, musia byť jasne definované a ich použitie musí byť opodstatnené.

Výhodnejšie je identifikovanie klonov genotypmi. Výskum (1) ukázal, že reprodukčná účinnosť klonu A, ktorý pochádza z IRCHA vo Francúzsku, (3) dôsledne vyhovuje kritériám validity v zmysle ≥ 60 potomkov na rodičovského živočícha prežívajúceho, keď sú kultivované za podmienok opísaných v tejto metóde. Sú však akceptovateľné aj iné klony, zabezpečujúce, že kultúra dafnií uspokojuje kritériá validity testu.

Na začiatku testu majú živočíchy menej ako 24 hod. a nesmú byť prvým vrhom potomstva. Mali by byť získané zo zdravého materiálu (t. j. nevykazujúc žiadne známky stresu ako vysoká mortalita, prítomnosť samčekov a ephippia oneskorenie v produkcii prvého potomstva, bezfarebné živočíchy atď.). Zásobné živočíchy musia byť udržiavané v kultivovaných podmienkach (svetlo, teplota, médium kŕmenie a počet organizmov na jednotku objemu) podobných tým, ktoré sa používajú pri teste. Ak médium dafniovej kultúry použité v teste je odlišné od bežnej kultúry dafnií, je dobré zaradiť pred testom aklimatizačnú periódu trvajúcu obvykle okolo troch týždňov (t. j. jedna generácia), aby sme sa vyhli skresľovaniu rodičovských živočíchov.

1.6.3 **Testovacie médium**

V tomto teste odporúčame použiť úplne definované médium. Tým sa môžeme vyhnúť použitiu aditív (napr. chalúh, pôdnych extraktov atď.), ktoré sú ťažko charakterizovateľné a zároveň sa zlepšujú možnosti štandardizácie medzi laboratóriami. Elendt M4 (4) a M7 médiá (pozri dodatok 1) sú vhodné na tento účel. Aj iné médiá napr. (5), (6) sú však akceptovateľné na zisťované účinnosti kultúry *Daphnia magna,* ak sa ukáže, že uspokojujú kritériá validity testu.

Ak sú použité médiá, ktoré obsahujú nedefinované aditíva, tieto aditíva musia byť špecifikované jasne a informácie musia byť poskytnuté vo výpise testu na zloženie, obzvlášť s dôrazom na obsah uhlíka, keďže toto môže napomôcť pri poskytovaných dávkach potravy. Odporúča sa, aby celkový organický uhlík (TOC) a/alebo chemicky požadovaný kyslík (COD) bol pri príprave zásoby organických aditív definovaný a bol vykonaný odhad výsledku k TOC/COD v testovanom médiu. Ďalej sa odporúča, aby úroveň TOC v médiu (t. j. pred prídavkom rias) bol pod 2 mg/l (7).

▼B

Keď testované látky obsahujú kovy, je dôležité rozpoznať, že vlastnosti testovaného média (t. j. tvrdosť, chelatačná kapacita – schopnosť vykonávať chelačné komplexy) môžu mať súvislosť s toxicitou testovanej látky. Z tohto dôvodu sa vyžaduje úplne definované médium, v súčasnosti sú však iba Elendt M4 a M7 plne definované médiá, ktoré sú vhodné na dlhožijúce kultúry *Daphnia magna.* Obidve médiá obsahujú chelátotvornú zložku EDTA (etyléndiamíntetraoktamín kyselina). Pri práci (2) sa ukázalo, že evidentná-zjavná toxicita kadmia je vo všeobecnosti nižšia, keď sa reprodukčný test vykonal v M4 a M7 médiách, ako v médiách neobsahujúcich EDTA. M4 a M7 nie sú doporučené na testovanie látok obsahujúcich kovy a iné médiá obsahujúce známe chelatotvorné zložky by sa nemali taktiež používať. Pre kov obsahujúce látky sa odporúča použiť alternatívne médium tak ako napr. ASTM znovu stanovená tvrdá čerstvá voda (7), ktorá neobsahuje žiadne EDTA, s pridaným extraktom z chalúh (8). Táto kontribúcia ASTM rekonštruovanej tvrdej čerstvej vody a chaluhového extraktu je tiež vhodná na dlhožijúce kultúry a testovanie *Daphnie magna* (2), hoci sa stále uplatňuje proces, pri ktorom sa tvoria mierne chelátové komplexy, spôsobené organickými zložkami v pridanom extrakte z chalúh.

Na začiatku a počas testu má byť koncentrácia rozpusteného kyslíka okolo 3 mg/l. pH v rozmedzí 6 – 9 a obvykle sa nemení viac ako 1,5 jednotky v žiadnom teste. Doporučená tvrdosť vody je približne 140 mg/l (ako $CaCO_3$). Testy na tejto úrovni a vyššej demonštrujú účinnosť reprodukcie v súlade s kritériami validity (9), (10).

1.6.4. **Testované roztoky**

Testovacie roztoky určitých koncentrácií sa obvykle pripravujú zriedením zásobného roztoku. Zásobné roztoky sa najčastejšie pripravujú rozpustením látky v testovacom médiu.

V niektorých prípadoch sa odporúča použitie organických rozpúšťadiel alebo látok tvoriacich disperziu, aby sa pripravil zásobný roztok v požadovanej koncentrácii, ale malo by byť vyvinuté všetko úsilie, aby sa vyhlo použitiu takýchto materiálov. Príklady vhodných rozpúšťadiel sú acetón, etanol, metanol, dimetyl-formanid a trietylénglykol. Príklady vhodných látok tvoriacich disperzie sú Cremophor RH 40, metylcelulóza 0,01 % a HCO-40. V niektorých prípadoch testovaná látka v testovacom roztoku by nemala dosiahnuť limit rozpustnosti v testovacom médiu.

Rozpúšťadlá sa používajú na prípravu zásobných roztokov, ktoré môžu byť presne dávkované priamo do vody. V odporúčaných koncentráciách rozpúšťadiel vo finálnom testovacom médiu (napr. < 0,1 ml/l), rozpúšťadlá uvedené vyššie nebudú toxické a nezvyšujú rozpustnosť danej látky vo vode.

Disperzanty (látky tvoriace disperzie) napomáhajú v presnom dávkovaní a pri tvorbe disperzií. V odporúčaných koncentráciách vo finálnom testovanom médiu (< 0,1 ml/l) látky tvoriace disperzie nie sú toxické a nezvyšujú rozpustnosť danej látky vo vode.

▼B

1.7. KONCEPCIA TESTU

Postupy by mali byť umiestnené v testovacích nádobách a všetky nasledujúce činnosti sú vykonávané náhodným spôsobom. Neúspech vykonaného môže byť výsledkom odchýlky vysvetľovanej koncentračným efektom. Najmä ak sú experimentálne jednotky zamenené v postupe alebo koncentračnom rade, potom niektoré časovo príbuzné efekty, ako napr. únava operátora alebo iné chyby môžu vniesť zvýšenie vplyvov pri vysokých koncentráciách. Okrem toho, ak výsledky testu majú tendenciu byť ovplyvnené počiatočnými alebo enviromentálnymi podmienkami testu, ako napr. umiestnením v laboratóriu, potom by sa malo zvážiť pozastavenie testu.

1.8. POSTUP

1.8.1. **Podmienky expozície**

1.8.1.1 *Trvanie*

Test trvá 21 dní.

1.8.1.2. *Loading*

Rodičovské živočíchy sú udržiavané individuálne, jeden na testovaciu nádobu s objemom 50 – 100 ml média v každej nádobe.

Väčšie objemy sú niekedy potrebné na uspokojenie požiadaviek analytického postupu použitého na stanovenie koncentrácie testovanej látky, hoci združovanie kópii na chemickú analýzu je tiež prípustné. Ak sa použijú objemy väčšie ako 100 ml, dávkovanie dané pre dafnie je potrebné zvýšiť na zabezpečenie primeranej dostupnosti potravy a v súlade s kritériami validity. Na prietočný test z technických príčin môže byť vybratá alternatívna koncepcia testu (napr. štyri skupiny po 10 živočíchoch vo veľkoobjemovom teste), ale všetky zmeny koncepcie testu musia byť zaznamenané.

1.8.1.3. *Počet živočíchov*

Na semistatický test je najmenej 10 živočíchov držaných samostatne, na každú testovanú koncentráciu najmenej 10 živočíchov je držaných v kontrolnej sérii.

Na prietočné testy je 40 živočíchov rozdelených do štyroch skupín po 10 na každú testovanú koncentráciu (1). Môže sa používať aj menší počet živočíchov a odporúča sa minimálne 20 živočíchov na koncentráciu rozdelených do dvoch alebo viacerých skupín s rovnakým počtom živočíchov (napr. štyri opakovania, každé s piatimi dafniami). Zapamätajte si, že pri testoch, pri ktorých sú zvieratá umiestnené v skupinách, nebude možné vyjadriť reprodukčný výstup ako celkový počet žijúcich potomkov vyprodukovaných na rodiča prežívajúceho do konca testu, ak rodičovský živočích uhynie. V tomto prípade reprodukčný výstup bude vyjadrený ako celkový počet žijúcich potomkov vyprodukovaných na rodiča prítomného na začiatku testu.

1.8.1.4. *Kŕmenie*

Pri semistatickom teste sa kŕmenie vykonáva denne, najmenej trikrát za týždeň (napr. zodpovedajúc zmenám média). Odchýlky od tohto musia byť zaznamenané (napr. pri prietočnom teste).

▼B

Počas testu sú rodičovské živočíchy kŕmené prednostne živými bunkami rias jednou alebo viacerými z nasledujúcich: Chlorella sp., Selenastrum capricornutum (teraz Pseudokirchneriella subcapitata) (11) a Scenedesmus subspicatus. Zásobovanie potravou je založené na množstve organického uhlíka (C) poskytovaného každému rodičovskému živočíchovi. Výskum (12) ukázal, že pre *Daphnia magna* je dávka na úrovni 0,1 – 0,2 mg C/dafnia/deň postačujúca na dosiahnutie požadovaného množstva mláďat, aby boli v súlade s kritériami validity testu. Prídel môže byť počas periódy testu dodávaný buď v stálej miere, alebo ak je žiaduce, v menšej miere môže byť použitý na začiatku a potom zvýšený počas testu, aby sa bral ohľad na rast rodičovského živočícha. V tomto prípade by mal prídel zostať v medziach odporúčaného rozpätia 0,1 – 0,2 mg C/dafnia/deň po celý čas.

Ak budú použité náhradné merania, ako napr. počet buniek rias alebo absorbcia svetla, aby sa naplnila úroveň dávky (napr. pretože meranie obsahu uhlíka je časovo náročné), každé laboratórium musí vytvoriť svoj vlastný nomogram, spojený s náhradným meraním obsahu uhlíka kultúry rias (pozri dodatok 2 – odporúčanie na: ako zostrojiť nomogram). Nomogram kontrolujeme najmenej raz do roka a častejšie, ak sa zmenili podmienky v kultúre rias. Zistilo sa, že svetelná absorbcia je lepšia náhrada za údaje o obsahu uhlíka ako počet buniek (13).

Koncentrovaná suspenzia rias sa pridáva k dafniám, aby sa minimalizoval objem kultúry rias prenášaný do testovacích návodov. Koncentrácia rias sa dosiahne odstreďovaním, po ktorom nasleduje znovuprevedenie na suspenziu v destilovanej vode, v deionizovanej vode alebo médiom kultúry dafnia.

1.8.1.5. *Svetlo*

16 hodín svetla o intenzite nepresahujúcej 15 – 20 μE. m^{-2}. s^{-1}

1.8.1.6. *Teplota*

Teplota testovaného média je v rozmedzí 18 – 22 °C, na žiaden test, ak je to možné, by sa však teplota nemala meniť viac ako o 2 °C v rámci týchto limitov (napr. 18 – 20 °C, 19 – 21 °C, 20 – 22 °C). Je vhodné použiť prídavnú testovaciu nádobu s cieľom monitoringu teploty.

1.8.1.7. *Vetranie*

Testovacia nádoba musí byť vetraná počas testu.

1.8.2. **Testovacie koncentrácie**

Obvykle sa požíva najmenej 5 testovacích koncentrácií zaradených do geometrických sérií so separačným faktorom nepresahujúcim hodnotu 3,2 a vhodným počtom opakovaní na každú testovanú koncentráciu (pozri odsek 1.8.1.3.). Musí byť poskytnuté potvrdenie, ak bolo použitých menej ako 5 koncentrácií. Látky sa netestujú v testovacích médiách nad hranicou rozpustnosti.

▼B

Pri stanovení koncentračného rozsahu je treba mať na pamäti:

i) ak je cieľom získať LOEC/NOEC, najnižšia testovaná koncentrácia musí byť dosť nízka, takže plodnosť pri tejto koncentrácii nie je značne nižšia ako v kontrolnej vzorke. Ak to tak nie je, test sa musí zopakovať s redukovanou najnižšou koncentráciou;

ii) ak je cieľom získať LOEC/NOEC, najvyššia testovaná koncentrácia musí byť dosť vysoká, takže plodnosť pri tejto koncentrácií je značne nižšia ako v kontrolnej vzorke. Ak to tak nie je, test sa musí opakovať, pričom sa zvýši najvyššia koncentrácia;

iii) ak je EC_X odhadovaný účinok na reprodukciu EC_X, je vhodné použiť postačujúcu koncentráciu na definovanie EC_X s vhodným stupňom spoľahlivosti. Ak je odhadnutý účinok EC_{50} na reprodukciu, je vhodné, aby najvyššia testovaná koncentrácia bola vyššia ako táto koncentrácia EC_{50}. Inak i keď bude ešte možné odhadnúť EC_{50}, interval spoľahlivosti na EC_{50} bude veľmi široký a nebude možné dostačujúco odhadnúť primeranosť vhodného modelu;

iv) rozsah testovaných koncentrácií by nemal zahŕňať žiadnu koncentráciu, ktorá má štatisticky významný efekt na prežívajúcich dospelých, keďže toto môže zmeniť charakter testu z jednoduchého reprodukčného na kombinovaný reprodukčný a test mortality vyžadujúci omnoho viac komplexnú štatistickú analýzu.

Prvotné znalosti o toxicite testovanej látky (napr. z akútneho testu a/alebo zo štúdie určenia rozsahu) pomôžu pri výbere vhodných testovaných koncentrácií.

Kde sa použije rozpúšťadlo alebo látka, aby sa napomohlo príprave testovacieho roztoku (pozri odsek 14.), finálna koncentrácia v testovacej nádobe nesmie byť väčšia ako 1ml/l a musí byť rovnaká vo všetkých testovacích nádobách.

1.8.3. **Kontrola**

Jedna kontrolná séria testovacieho média a ak je to podstatné, tak aj jedna kontrolná séria obsahujúca rozpúšťadlo a látky tvoriace disperzie, sa musí analyzovať v testovanej sérii. Keď sa použijú, koncentrácia rozpúšťadla a látky tvoriacej disperziu musí byť rovnaká ako v nádobe obsahujúcej testovanú látku. Použije sa vhodný počet opakovaní, paralelných stanovení (pozri odsek 1.8.1.3.).

Všeobecne v dobre prebiehajúcom teste variačný koeficient okolo významného počtu žijúcich potomkov vyprodukovaných na jedného rodičovského živočícha v kontrolnej vzorke je $\leq$ 25 % a toto je popísané na testovaciu koncepciu používajúcu individuálne chované živočíchy.

1.8.4. **Obnova testovaného média**

Frekvencia obnovy testovacieho média závisí od stability testovacej látky, ale musí sa obnoviť najmenej trikrát za týždeň. Ak z úvodných testov stability (pozri odsek 14) je zrejmé, že koncentrácia testovanej látky je nestabilná (t. j. mimo rozsahu 80 – 120 % nominálu alebo poklesne pod 80 % nameranej počiatočnej koncentrácie) cez maximálnu periódu obnovy (t. j. tri dni), mala by sa venovať pozornosť častejšej obnove média alebo používať priebežný prietočný test.

▼B

Keď je médium vymieňané v semistatickom teste, pripraví sa druhá séria testovacích nádob a rodičovské živočíchy sú prenesené do nich, napríklad sklenenou pipetou vhodného priemeru. Objem média preneseného s dafniami musí byť minimálny.

1.8.5. **Pozorovania**

Výsledky pozorovaní urobených počas testu sa zaznamenajú do hárku údajov (pozri príklady v dodatkoch 3 a 4). Ak sa vyžadujú iné merania, môžu byť požadované dodatočné pozorovania.

1.8.6. **Potomok**

Potomok vyprodukovaný každým rodičovským živočíchom je radšej premiestnený a počíta sa denne od objavenia sa prvého potomstva, aby sa im zabránilo konzumovať potravu určenú pre dospelých jedincov. Na účel tejto metódy je potrebné počítať iba počet žijúcich potomkov, ale prítomnosť nedozretých vajíčok alebo nežijúci potomkovia musia byť zaznamenané.

1.8.7. **Mortalita**

Mortalitu medzi rodičovskými živočíchmi zaznamenávajte denne aspoň v rovnakom čase, ako je počítané potomstvo.

1.8.8. **Iné parametre**

Hoci táto metóda je principiálne stanovená, vytvorená na odhadovanie vplyvov na reprodukciu, je možné, že iné vplyvy môžu byť tiež dostatočne kvantifikované, aby umožnili štatistickú analýzu. Merania rastu sú vysoko žiaduce, keďže zadovažujú informácie o možných subletálnych vplyvoch, ktoré sú užitočnejšie ako meranie reprodukcie samotné, meranie dĺžky rodičovských živočíchov (t. j. dĺžka tela bez análnej kosti) sa odporúča na konci testu. Iné parametre môžeme merať alebo počítať zahŕňajúc čas prvého potomstva (a nasledujúcich vrhov), počet a veľkosť vrhov na jedného živočícha, počet premrhaných vrhov, prítomnosť samčekov a efipia a vnútorný pomer rastu populácie.

1.8.9. **Frekvencia analytických stanovení a meraní**

Koncentrácia kyslíka, teplota, tvrdosť vody a pH hodnoty sa merajú aspoň raz za týždeň v čerstvom a starom médiu, v kontrolnom a pri vyšších koncentráciách testovanej látky.

Koncentrácia testovanej látky počas testu je stanovená v pravidelných intervaloch.

V semistatických testoch, kde je očakávaná zostávajúca koncentrácia testovanej látky v rozmedzí ± 20 % z nominálu (t. j. v rozsahu 80 – 120 %, pozri 1.4. a 1.8.4.) sa odporúča ako minimum, najvyššia a najnižšia testovaná koncentrácia je analyzovaná, keď je čerstvo pripravená a v čase obnovy počas prvého týždňa testu (t. j. analýza sa vykoná na vzorke z rovnakého roztoku – keď je čerstvo pripravený a obnovený.) Tieto stanovenia sú potom opakované aspoň raz za týždeň.

▼B

V testoch, kde sa neočakáva zostatková koncentrácia testovanej látky v rozmedzí ± 20 % nominálu, je potrebné analyzovať všetky testované koncentrácie testovanej látky, keď sú čerstvo pripravené a po obnove. Hoci na tieto testy, kde má meraná počiatočná koncentrácia testovanej látky nie je v rozmedzí ± 20 % nominálu, ale kde dostatočná evidencia môže preukázať, že počiatočná koncentrácia je opakovateľná a stabilná (t. j. v rozsahu 80 – 120 % z počiatočnej koncentrácie), chemické stanovenia sa zredukujú v týždňoch 2 a 3 na test najvyššej a najnižšej testovanej koncentrácie. Vo všetkých prípadoch stanovenie koncentrácií testovanej látky na obnovu sa vyžaduje vykázať iba v jednej nádobe na každú testovanú koncentráciu.

Ak sa použije priebežný (prietočný test), je vhodný podobný vzorkovací režim ako bol popísaný pri semistatickom teste (ale meranie „starého“ roztoku nie je v tomto prípade aplikovateľné). Hoci môže byť vhodné zvýšiť počet vzorkovacích príležitostí počas prvého týždňa (t. j. tri skupiny meraní), aby sa zistilo, že testované koncentrácie zostávajú stabilné. V týchto typoch testov pomer prietoku riedidla a testovanej látky musí byť kontrolovaný denne.

Ak je evidencia koncentrácie látky, ktorá je testovaná, uspokojivo zachovaná v rozmedzí ± 20 % nominálnej alebo počiatočnej koncentrácie počas testu, potom výsledky môžu byť založené na nominálnych alebo počiatočných nameraných hodnotách. Ak odchýlka od nominálnej alebo počiatočnej nameranej koncentrácie je väčšia ako ± 20 %, výsledky budú vyjadrené v pojmoch čas – hmotnosť (pozri dodatok 5).

2. ÚDAJE A VÝSLEDKY

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Účelom tohto testu je stanoviť efekt testovanej látky na celkový počet živých potomkov vyprodukovaných jedným rodičovským živočíchom prežívajúcim do konca testu. Celkový počet potomkov na rodičovského živočícha sa vypočíta na každú testovaciu nádobu (t. j. replikát – opakovanie). Ak v niektorom opakovaní rodičovský živočích uhynie počas testu alebo sa zmení na samčeka, potom sa replikát vylúči z analýzy. Analýza sa bude následne zakladať na redukovanom počte replikátov.

Na odhad LOEC ako aj na NOEC na vplyvy chemikálií na reprodukčný výstup je potrebné vypočítať významný reprodukčný výstup cez replikáty cez každú koncentráciu a združené reziduálne štandardné odchýlky, môže sa to vykonať za použitia analýzy rozptylu (ANOVA). Priemer na každú koncentráciu musí byť potom porovnaný s priemerom kontrolnej vzorky za použitia vhodnej niekoľkonásobnej porovnávacej metódy Dunnettov alebo Williamsov test je užitočný (14), (15), (16), (17). Je potrebné kontrolovať, či ANOVA dodržiava predpoklad homogenity rozptylu. Odporúča sa vykonať test graficky skôr ako cestou testu formálneho významu (18); vhodná alternatíva je urobiť Barlettov test. Ak sa nedodrží tento predpoklad, potom je pozornosť zameraná na transformáciu údajov do homogenizačného rozptylu pred použitím ANOVA alebo vykonať vážený ANOVA. Veľkosť vplyvu detegovaná použitím ANOVA (t. j. najmenšia významná odchýlka) musí byť vypočítaná a zaznamenaná.

▼B

Na odhad koncentrácie, ktorá môže spôsobiť 50 % pokles v reprodukčnom výstupe (t. j. EC_{50}), by mala byť vhodná krivka z dát, ako napr. logaritmická krivka vyhotovená za použitia štatistickej metódy, ako napr. metódy najmenších štvorcov. Krivka má mať také parametre, aby sa EC_{50} a jej štandardná odchýlka mohli priamo odhadnúť. Toto veľmi uľahčí výpočet intervalov spoľahlivosti okolo EC_{50}. Pokiaľ nie sú dostatočné dôvody na uprednostnenie odlišných hladín spoľahlivosti, mali by sa uviesť dvojstranné 95 % intervaly hladín spoľahlivosti. Vhodný postup bude predovšetkým poskytovať prostriedky na odhadnutie významu straty primeranosti. Môžeme to spraviť graficky alebo podielom zostatkovej sumy štvorcov v „strate prítomnosti“ a „čistej chyby zložiek“ a vykonaním testu významnosti na stratu primeranosti. Pretože postupy dávajúce vysokú plodnosť majú tendenciu viac variovať v počte vyprodukovaných potomkov ako procesy vykazujúce nízku plodnosť, pozornosť by sa mala upriamiť na váženie spozorovaných hodnôt s cieľom zobrazenia rôzneho rozptylu v odlišných procesových skupinách [pozri základné informácie (18)].

V analýze údajov z finálneho kruhového testu (2) logistická krivka bola prispôsobená použitím nasledujúceho modelu, hoci aj iné vhodné modely môžu byť použité:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

kde:

Y: = celkový počet mláďat na rodičovského živočícha prežívajúceho do konca testu (vypočítané na každú nádobu)

x: = koncentrácia látky

c: = očakávaný počet mláďat, keď x = 0

x_0: = EC_{50} v populácii

b: = tangenta (nábehový parameter)

Tento model je prijateľný vo veľkom počte situácií, ale sú tu testy, na ktoré nie je vhodný. Je potrebné vykonať kontrolu validity modelu, ako bolo odporúčané vyššie. V niektorých prípadoch môže byť vhodný hormesis model, ktorý pri nízkych koncentráciách dáva zvýšený efekt (19).

Ostatné vplyvy koncentrácií, ako napr. EC_{10} a EC_{20} môžu byť tiež odhadnuté, hoci môže byť výhodnejšie použiť iné určenie parametrov modelu z toho použitého na odhad EC_{50}.

2.2. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí zahŕňať nasledujúce:

2.2.1. **Testovaná látka:**

— fyzikálny charakter a podstatné fyzikálno-chemické vlastnosti,

▼B

— chemické identifikačné údaje vrátane čistoty.

2.2.2. **Testované druhy:**

— klony (či sú geneticky otypované), dodávateľ a zdroj (ak je známy) a použité podmienky kultúr. Ak sú použité iné druhy ako *Daphnia magna*, musí to byť uvedené a odôvodnené.

2.2.3. **Podmienky testu:**

— použitý testovací postup (procedúra, metóda), (napr. semistatická, objem, dávkovanie v počte dafnií na liter),

— fotoperióda a intenzita svetla,

— koncepcia testu (napr. počet paraleliek, replík, opakovaní, počet rodičov na paralelu, repliku),

— detaily o použitom médiu kultúry,

— ak bol použitý, prídavky organických látok zahrňujúce zloženie, zdroj, metódu prípravy, TOC/COD zásobné roztoky, odhad výsledného TOC/COD v testovanom médiu,

— podrobné informácie o kŕmení zahrňujúce množstvo v (mg C/*Daphnia*/deň) a tabuľku (napr. typ potravy, zahrňujúc špecifický druh rias a ak je známy, tak aj rod, podmienky kultúry),

— metódu prípravy zásobného roztoku a frekvenciu obnovy (roztok alebo dispergovadlo a ak boli použité, musia byť udané ich koncentrácie).

2.2.4. **Výsledky:**

— výsledky nejakých predbežných štúdií stability testovacej látky,

— nominálne testované koncentrácie a výsledky všetkých analýz na stanovenie koncentrácie testovanej látky v testovacích nádobách, (pozri príklad na hárky údajov – výpisy dodatok 4), účinnosť pokrytia metódy a medza stanoviteľnosti musia byť uvedené,

— kvalita vody v rámci testovacích nádob (t. j. pH, teplota, koncentrácia rozpusteného kyslíka, TOC a/alebo COD a tvrdosť vody, kde je to možné) (pozri príklad na hárky údajov – dodatok 3),

— úplný záznam žijúcich potomkov na každého rodičovského živočícha (pozri príklad na karty bezpečnostných údajov – dodatok 3),

— počet uhynutých medzi rodičovskými živočíchmi a dni, v ktorých sa vyskytli (pozri príklad na karty bezpečnostných údajov – dodatok 3),

— koeficient kontroly plodnosti (založený na celkovom počte žijúcich potomkov na rodičovského živočícha prežívajúceho do konca testu),

— graf celkového počtu žijúceho potomstva na jedného rodičovského živočícha (na každú repliku, paralelu), prežívajúceho do konca testu versus koncentrácia testovanej látky),

— najnižšia zistená efektívna koncentrácia (LOEC) na reprodukciu obsahujúca popis štatisticky používaných metód a indikácia, akej veľkosti je detegovaný a nezistiteľné účinná koncentrácia (NOEC) na reprodukciu, keď je to vhodné, LOEC/NOEC na mortalitu rodičovských živočíchov musí byť tiež uvedené,

▼B

— keď je to vhodné, EC_x na reprodukciu a intervaly spoľahlivosti, graf zodpovedajúceho modelu používaného na ich výpočet, tangenta krivky dávkovej odozvy a j ej štandardnej chyby,

— ostatné zistené biologické efekty alebo meranie: výpis ostatných biologických efektov, ktoré boli získané alebo namerané (napr. rast rodičovských živočíchov) vrátane všetkých vhodných odôvodnení,

— vysvetlenie na každú odchýlku od testovacej metódy.

3. **POUŽITÁ LITERATÚRA**

(1) OECD Test Guideline Programme, Report of the Workshop on the *Daphnia magna* Pilot Ring Test, Sheffield University, UK, 20 – 21 March 1993.

(2) OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 6. Report of the Final Ring Test of the *Daphnia magna* Reproduction Test Paris. 1997.

(3) Baird D. J., Barber J., Bradley M. C, Soares A. M. V. M. and Calow P. (1991). A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Strauss. Ecotoxicology and Environmental Safety, 21, s. 257 – 265.

(4) Elendt B. P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage *in Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, s. 25 – 33.

(5) EPA (1993). Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. (Fourth ed.). EPA/600/4-90/027F. C. I. Weber (ed), USEPA, Cincinnati, Ohio.

(6) Vigano L., (1991) Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing *Daphnia magna.* Bull. Environ. Contam. Toxicol, 47, s. 775 – 782.

(7) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Acute Toxicity Tests with Fishes, Macroinvertebrates and Amphibians. E729-88a. American Society for Testing and Materials, Philadelphia P. A. 20 pp.

(8) Baird D. J., Soares A. M. V. M., Girling A., Barber J., Bradley M. C. and Calow P. (1989). The long term maintenance of *Daphnia magna* Straus for use in ecotoxicological tests; problems and prospects. In:Proceedings of the 1st European Conference on Ecotoxicology. Copenhagen 1988 (H.Løkke, H. Tyle & F. Bro-Rasmussen. Eds.), s. 144 – 148.

(9) Parkhurst B. R., Forte J. L. and Wright G. P. (1981). Reproducibility of a life-cycle toxicity test with *Daphnia magna.* Bull. Environ. Contam. and Toxicol., 26, s. 1 – 8.

(10) Cowgill U. M. and Milazzo D. P. (1990) The sensitivity of two cladocerans to water quality variables: salinity and hardness. Arch. Hydrobiol, 120(2), s. 185 – 196.

(11) Korshikov (1990). *Pseudokirchneriella subcapitata* Hindak, F-1990. Biologice Prace, 36, 209.

(12) Sims I. R., Watson S. and Holmes D. (1993). Toward a standard *Daphnia* juvenile production test. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, s. 2053 – 2058.

▼B

(13) Sims I. (1993). Measuring the growth of phytoplankton: the relationship between total organic carbon with three commonly used parameters of algal growth. Arch. Hydrobiol, 128, s. 459 – 466.

(14) Dunnett C. W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, s. 1096 – 1121.

(15) Dunnett C. W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, s. 482-491.

(16) Williams D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27, s. 103 – 117.

(17) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28, s. 510 – 531.

(18) Draper N. R. and Smith H. (1981). Applied Regression Analysis, second edition, Wiley, N.Y.

(19) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, s. 93 – 96.

(20) Wilson E. O. and Bossert, W. H. (1971). A Primer of Population Biology. Sinauer Associates Inc.Publishers.

(21) Poole R. W. (1974). An Introduction to quantitative Ecology. McGraw-Hill Series in Population Biology, New York, s. 532.

(22) Meyer J. S., Ingersoll C. G, McDonald L. L. and Boyce M. S. (1986). Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs bootstrap techniques. Ecology, 67, s. 1156 – 1166.

▼B

DODATOK 1

PRÍPRAVA PLNE DEFINOVANÉHO MÉDIA ELENDT M7 A M4

Aklimatizácia do Elendt M7 a M4 média

Niektoré laboratóriá podstúpili ťažkosti pri priamom prenose *Daphnia* do média M4 (1) a M7. Určité úspechy sa dosiahli postupnou aklimatizáciou, t. j. premiestnením z vlastného prostredia do 30 percentného Elendtu, potom do 60 percentného Elendtu a potom do 100 percentného Elendtu. Aklimatizačné periódy môžu byť dlhé až jeden mesiac.

PRÍPRAVA

Stopové prvky

Separované zásobné roztoky (I) jednotlivých stopových prvkov sú najprv pripravované vo vode vhodnej čistoty, napr. deionizovaná, destilovaná alebo voda získaná reverznou osmózou. Z týchto rôznych zásobných roztokov (I) je pripravený druhý samostatný (jednoduchý) zásobný roztok (II), ktorý obsahuje všetky stopové prvky (kombinovaný roztok), t. j.:

Zásobný roztok I (samostatná látka)	Množstvo pridávané k vode (mg/l)	Koncentrácia (vo vzťahu k médiu M4)	Na prípravu kombinovaného zásobného roztoku II pridajte nasledujúce množstvo zásobného roztoku I do vody (ml/l)	
			M4	M7
H_3BO_3	57 190	20 000	1,0	0,25
MnCl * 4 H_2O	7 210	20 000	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000	1,0	0,25
RbCl	1 420	20 000	1,0	0,25
$SrCl_2$ * 6 H_2O	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
Na_2MoO_4 * 2 H_2O	1 260	20 000	1,0	0,25
$CuCl_2$ * 2 H_2O	335	20 000	1,0	0,25
$ZnCl_2$	260	20 000	1,0	1,0
$CoCl_2$ * 6 H_2O	200	20 000	1,0	1,0
KI	65	20 000	1,0	1,0
Na_2SeO_3	43,8	20 000	1,0	1,0
NH_4VO_3	11,5	20 000	1,0	1,0
Na_2EDTA * 2 H_20	5 000	2 000	—	—
$FeSO_4$ * 7 H_2O	1 991	2 000	—	—
Posledné dva roztoky Na_2EDTA a $FeSO_4$ sa pripravujú jednotlivo, nalievajú sa spolu a hneď sa autoklávujú:				
21 Fe-EDTA roztok		1 000	20,0	5,0

▼B

Médiá M4 a M7

Médiá M4 a M 7 sa pripravujú použitím zásobného roztoku II, makroživín a vitamínov nasledujúcim spôsobom:

	Množstvo pridávané k vode (mg/l)	Koncentr ácia (vo vzťahu k médiu M4)	Množstvo zásobného roztoku pridávaného na prípravu média (ml/l)	
			M4	M7
Zásobný roztok II kombinované stopové prvky		20	50	50
Zasobný roztok makroživín (jedna látka)				
$CaCl_2$ * 2 H_2O	293 800	1 000	1,0	1,0
$MgSO_4$ * 7 H_2O	246 600	2 000	0,5	0,5
KC1	58 000	10 000	0,1	0,1
$NaHCO_3$	64 800	1 000	1,0	1,0
Na_2SiO_3 * 9 H_2O	50 000	5 000	0,2	0,2
$NaNO_3$	2 740	10 000	0,1	0,1
KH_2PO_4	1 430	10 000	0,1	0,1
K_2HPO_4	1 840	10 000	0,1	0,1
Zásobný roztok kombinovaných vitamínov	—	10 000	0,1	0,1
Zásobný roztok kombinovaných vitamínov sa pripravuje pridaním 3 vitamínov do 1 l vody, ako je uvedené nižšie:				
Tiamín hydrochlorid	750	10 000	—	—
Kyanokobalamin (B_{12})	10	10 000	—	—
Biotin	7,5	10 000	—	—

Zásobný roztok kombinovaných vitamínov sa uskladňuje zamrazený v malých alikvótnych dieloch. Vitamíny sa do média pridávajú krátko pred použitím.

Poznámka 1 Aby sa zabránilo vyzrážaniu solí pri príprave kompletného média, pridáme alikvótne diely zásobného roztoku do približne 500 – 800 ml deionizovanej vody a potom doplníme do 1 litra.

Poznámka 2 Prvá zmienka o médiu M4 sa nachádza v publikácii od autora: Elendt, B.P. z r. 1990 s názvom Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. Protoplasma, 154, s. 25 – 33.

▼B

DODATOK 2

ANALÝZA CELKOVÉHO ORGANICKÉHO UHLÍKA (TOC) A TVORBA MONOGRAMU NA OBSAH TOC RIASOVÉHO KRMIVA

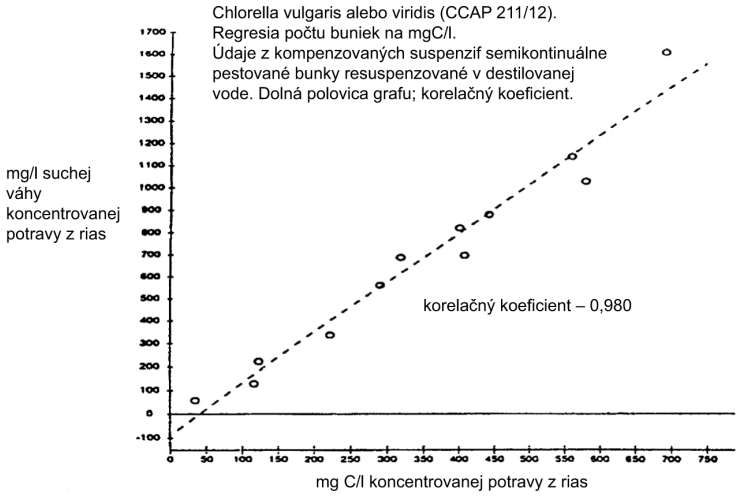
Je známe, že obsah uhlíka v riasách nie je obvykle meraný priamo, ale pomocou korelácií (t. j. nomogramov), náhradných meraní ako napr. počtu buniek rias alebo absorbancie svetla.

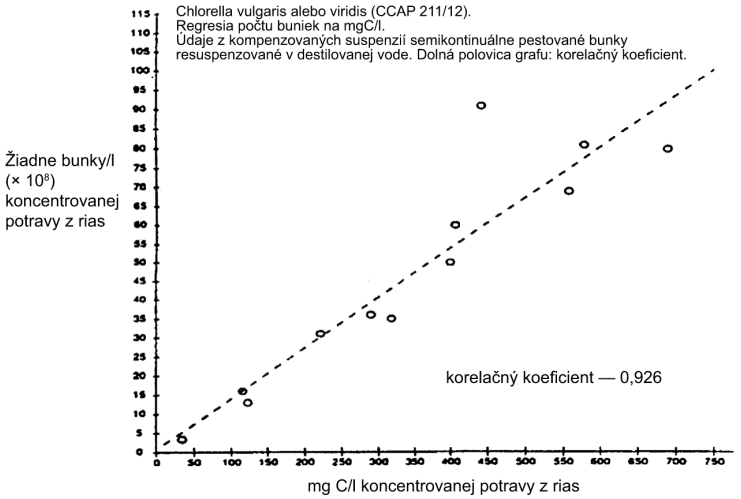
TOC by malo byť merané metódou vysokoteplotnej oxidácie radšej ako UV alebo persulfátovou metódou (pozri The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WCIV 6HB).

Na prípravu nomogramu riasy sa separujú z rastového prostredia (média) odstreďovaním, po ktorom nasleduje znovu prevedenie rozpustené na suspenziu v destilovanej vode. Meranie náhradných parametrov a TOC koncentrácie v každej vzorke sa opakuje trikrát. Urobíme slepý pokus v destilovanej vode a koncentrácia TOC sa odhadne z TOC koncentrácie vzorky rias.

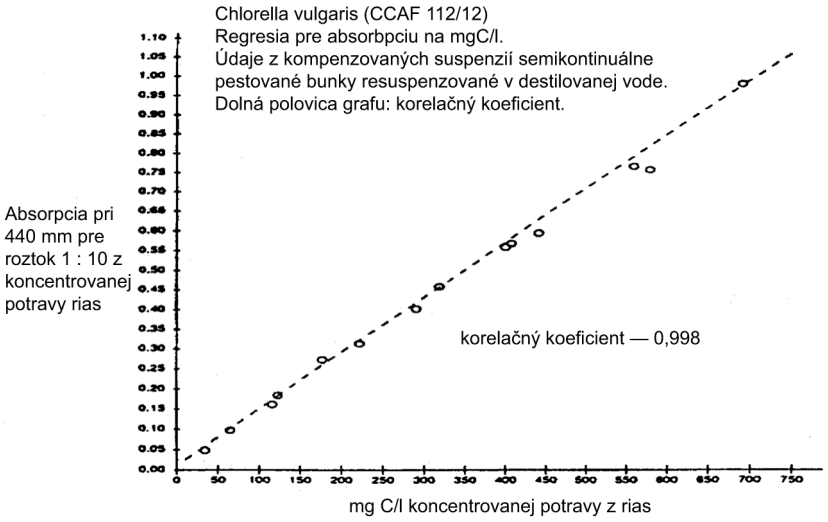
Nomogram by mal byť lineárny v celom rozsahu požadovaných koncentrácií uhlíka. Príklady sú uvedené nižšie.

Poynámka: Tieto nemôžu byť použité na konverziu, je potrebné, aby si laboratóriá pripravili ich vlastné nomogramy.





▼B


Chlorella vulgaris (CCAF 112/12)
Regresia pre absorbpciu na mgC/l.
Údaje z kompenzovaných suspenzií semikontinuálne pestované bunky resuspenzované v destilovanej vode.
Dolná polovica grafu: korelačný koeficient.
Absorpcia pri 440 mm pre roztok 1 : 10 z koncentrovanej potravy rias
korelačný koeficient — 0,998
mg C/l koncentrovanej potravy z rias

▼B

DODATOK 3

PREHĽAD ÚDAJOV ZAZNAMENÁVAJÚCICH OBNOVU MÉDIA, FYZIKÁLNYCH A CHEMICKÝCH ÚDAJOV, KŔMENIE, REPRODUKCIU DAFNIÍ A MORTALITU DOSPELÝCH JEDINCOV

Číslo pokusu:	Údaje datované k:				Klon:				Médium:				Druh potravy:				Testovaná látka:				Nominálna koncentrácia:			
Deň	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Obnova média (háčik)																								
PH ([1])																							nová	
																							stará	
O_2 mg/l ([1])																							nová	
																							stará	
Teplota (ºC) ([1])																							nová	
																							stará	
Podané krmivo (háčik)																								
Žiadny živý potomok ([2])																								Celková
Nádoba 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

▼B

Číslo pokusu:	Údaje datované k:				Klon:				Médium:					Druh potravy:				Testovaná látka:					Nominálna koncentrácia:	
Deň	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
6																								
7																								
8																								
9																								
10																								
																							Celková	
Kumulovaná úmrtnosť dospelých jedincov ([3])																								

([1]) Určuje, ktorá nádoba bola použitá pri pokuse.
([2]) Záznam prerušených vrhov ako „AB“ v príslušnej kolónke.
([3]) Záznam úmrtnosti dospelých živočíchov označených ako „M“ v príslušnej kolónke.

▼B

DODATOK 4

PREHĽAD ÚDAJOV TÝKAJÚCICH SA ZAZNAMENÁVANIA VÝSLEDKOV CHEMICKÝCH ANALÝZ

a) **Merané koncentrácie**

Nominálna koncentrácia	Týždeň/vzorka č. 1		Týždeň/vzorka č. 2		Týždeň/vzorka č. 3	
	Čerstvá	Stará	Čerstvá	Stará	Čerstvá	Stará

b) **Merané koncentrácie ako percento z nominálu**

Nominálna koncentrácia	Týždeň/vzorka č. 1		Týždeň/vzorka č. 2		Týždeň/vzorka č. 3	
	Čerstvá	Stará	Čerstvá	Stará	Cerstva	Stará

▼B

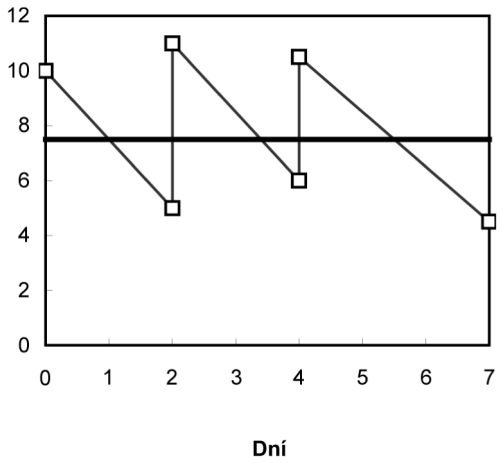
DODATOK 5

VÝPOČET ČASOVO-VÁŽENÉHO PRIEMERU

Je známe, že koncentrácia testovanej látky môže poklesnúť v perióde medzi obnovou (výmenou) média, preto je to potrebné brať do úvahy, aká koncentrácia sa vybrala ako reprezentatívna z rozsahu koncentrácií skúšaných rodičovskou dafniou. Výber musí byť založený tak na biologickom význame ako aj na štatistickom. Napríklad ak je reprodukcia myslená predovšetkým vrcholom odskúšanej koncentrácie, potom sa musí použiť maximálna koncentrácia. Hoci ak je dlhotrvajúci alebo akumulovaný vplyv jedovatej látky považovaný za dôležitejší, priemerná koncentrácia je významnejšia. V tomto prípade použiteľný vhodný priemer je časovo vážená priemerná koncentrácia – vysvetlenie variácií (odchýlok) v okamžitej koncentrácii v čase.

Obrázok 1:

Príklad časovo-váženého priemeru



Obrázok 1 znázorňuje príklad zjednodušeného testu trvajúceho sedem dní s médiom obnoveným v dňoch 0, 2 a 4.

Tenká cik-cakova krivka predstavuje koncentráciu v akomkoľvek časovom bode. Predpokladá sa, že pokles koncentrácie bude sprevádzať exponenciálny rozkladný proces.

Šesť zobrazených bodov predstavuje zistené koncentrácie namerané na začiatku a konci každej periódy obnovy.

Hrubá čiara indikuje (určuje) pozíciu časovo-váženého priemeru.

Časovo-vážený priemer je vypočítaný tak, že plocha pod časovo-váženým priemerom je rovná plocha pod koncentračnou krivkou. Na vyššie uvedený príklad je ilustrovaný výpočet v tabuľke 1.

▼B

Tabuľka 1

Výpočet časovo-váženého priemeru

Číslo výmeny	Dni	Koncentrácia 0	Koncentrácia 1	Ln(konc.0)	Ln(konc.1)	Plocha
1	2	10,000	4,493	2,303	1,503	13,767
2	2	11,000	6,037	2,398	1,798	16,544
3	3	10,000	4,066	2,303	1,403	19,781
Celkový počet dní: 7					Celková plocha	50,091
					Časovo-vážený priemer	7,156

Dni = počet dní v období výmeny

Koncentrácia 0 je nameraná koncentrácia na začiatku každého obdobia výmeny

Koncentrácia 1 je nameraná koncentrácia na konci každého obdobia výmeny

Ln(konc.0) = prirodzený logaritmus koncentrácie 0

Ln(konc1) = prirodzený logaritmus koncentrácie 1

Plocha je plocha pod exponenciálnou krivkou na každé obdobie výmeny. Vypočítava sa podľa:

$$\text{plocha} = \frac{Conc0 - Conc1}{Ln(Conc0) - Ln(Conc1)} \times \textit{počet dní}$$

Časovo-vážený priemer je *celková plocha* vydelená celkovým *počtom dní.*

Je samozrejmé, že pri reprodukčnom teste sa u dafnií rozšíri, aby pokryla 21 dní.

Je zrejmé, že pokiaľ sa pozorovania uskutočňujú iba na začiatku a konci každého obdobia výmeny, nie je možné potvrdiť, že rozkladný proces je skutočne exponenciálny. Rôzne výpočty plochy sa prejavia rôznymi krivkami. Exponenciálny rozkladný proces je však nepravdepodobný a v prípade chýbajúcich informácií je vhodné použiť najlepšiu krivku.

Ak chemická analýza nenájde žiadnu látku na konci obdobia výmeny, je potrebné na to upozorniť. Ak nie je možné odhadnúť, ako rýchlo sa látka stráca z roztoku, je taktiež nemožné získať skutočnú plochu pod krivkou, a preto nemožno získať príslušný časovo-vážený priemer.

▼B

C.21. PÔDNE MIKROORGANIZMY: TEST TRANSFORMÁCIE DUSÍKA

1. METÓDA

Táto metóda zodpovedá OECD TG 216 (2000).

1.1. ÚVOD

Táto testovacia metóda opisuje laboratórnu metódu, určenú na stanovenie dlhodobých účinkov chemikálií po jednorazovej expozícii na aktivitu pôdnych mikroorganizmov transformovať dusík. Test sa v podstate zakladá odporúčaniach Organizácie na ochranu rastlín v Európe a stredomorskej oblasti (1). Zohľadnili sa však aj ďalšie usmernenia vrátane German Biologische Bundesanstalt (2), US Environmental Protection Agency (3), SETAC (4) a Medzinárodnej organizácie pre normalizáciu (5). Na OECD workshope o výbere pôd/-sedimentov, ktorý sa konal v Belgirate, Taliansko, v roku 1995 (6) sa dohodlo množstvo a typy pôd používaných v tomto teste. Odporúčania pre odoberanie, manipuláciu a skladovanie vzoriek pôdy sa zakladajú na Usmerňovačom dokumente ISO (7) a odporúčaniach z workshopu v Belgirate. Pri posudzovaní a hodnotení toxických vlastností testovaných látok sa môže vyžadovať stanovenie účinkov na mikrobiálnu aktivitu pôdy, napr. keď sa vyžadujú údaje o potenciálnych vedľajších účinkoch výrobkov na ochranu rastlín na pôdnu mikroflóru, alebo keď sa predpokladá expozícia pôdnych mikroorganizmov inými chemikáliami, ako sú výrobky na ochranu rastlín. Test transformácie dusíka sa vykonáva na stanovenie účinkov takýchto chemikálií na pôdnu mikroflóru. Ak sa testujú agrochemikálie (napr. výrobky na ochranu rastlín, hnojivá, chemikálie používané v lesníctve) vykonáva sa test transformácie dusíka a aj test transformácie uhlíka. Ak sa testujú iné látky ako agrochemikálie, test transformácie dusíka je postačujúci. Ak však hodnoty EC_{50} testu transformácie dusíka pre takéto chemikálie ležia v rozsahu zistenom pre komerčne dostupné inhibitory nitrifikácie (napr. nitrapyrín), môže sa vykonať test transformácie uhlíka, aby sa získali ďalšie informácie.

Pôdy pozostávajú zo živých a neživých zložiek, ktoré existujú v komplexných a heterogénnych zmesiach. Mikroorganizmy zohrávajú významnú úlohu pri rozkladaní a transformácii organických látok v úrodných pôdach, pričom mnohé druhy prispievajú k rôznym aspektom úrodnosti pôdy. Každý dlhodobý vplyv na tieto biochemické procesy by mohol potenciálne narušiť obeh živín a toto by mohlo ovplyvniť úrodnosť pôdy. Transformácia uhlíka a dusíka sa vyskytuje vo všetkých úrodných pôdach. Aj keď sa mikrobiálne populácie, ktoré sú zodpovedné za tieto procesy, odlišujú v prípade jednotlivých pôd, cesty transformácie sú v podstate rovnaké.

Táto opísaná testovacia metóda je určená na stanovenie dlhodobých nepriaznivých účinkov látky na proces transformácie dusíka v aeróbnych povrchových pôdach. Testovacia metóda umožňuje aj stanovenie účinkov látky na transformáciu uhlíka v pôdnej mikroflóre. Tvorba dusíka sa uskutočňuje následne po degradácii väzieb medzi uhlíkom a dusíkom. Preto, ak sa rovnaké miery produkcie dusíka zistia v ošetrenej a kontrolnej pôde, je veľmi pravdepodobné, že hlavné cesty degradácie sú neporušené a funkčné. Substrát vybratý na test (prášková múka z lucerny) má vhodný pomer uhlíka a dusíka (zvyčajne medzi 12/1 a 16/1). Na základe tohto sa deficit uhlíka počas testu zníži a ak sú mikrobiálne populácie poškodené chemikáliou, môžu sa v priebehu 100 dní zotaviť.

▼B

Testy, z ktorých sa táto testovacia metóda vyvinula, boli prednostne určené pre látky, pri ktorých sa dá predpokladať množstvo, ktoré sa dostane do pôdy. Toto je prípad, napríklad výrobkov na ochranu rastlín, pri ktorých je známa aplikačná dávka v teréne. V prípade agrochemikálií postačuje testovanie dvoch dávok, ktoré zodpovedajú predpokladanej alebo predpovedanej aplikačnej dávke. Agrochemikálie sa môžu testovať ako aktívne zložky (a.z.) alebo ako zložené výrobky. Test sa však neobmedzuje na agrochemikálie. Zmenením množstva testovanej látky aplikovanej na pôdu a aj spôsobu, akým sa údaje vyhodnocujú, sa môže test použiť aj na chemikálie, v prípade ktorých nie je známe predpokladané množstvo, ktoré sa dostane do pôdy. A takto sa pre iné chemikálie ako agrochemikálie stanovia účinky série koncentrácií na transformáciu dusíka. Údaje z týchto testov sa použijú na prípravu krivky reakcie na dávku a vypočítajú sa hodnoty EC_x, kde x je definovaný účinok v percentuálnom vyjadrení.

1.2. DEFINÍCIE

Transformácia dusíka: konečná degradácia organickej látky, ktorá obsahuje dusík, mikroorganizmami prostredníctvom procesu amonifikácie a nitrifikácie na príslušný anorganický konečný produkt nitrát.

EC_x (Efektívna koncentrácia): je koncentrácia testovanej látky v pôde, ktorá spôsobí x percentnú inhibíciu transformácie dusíka na nitrát.

EC_{50} (Stredná efektívna koncentrácia): je koncentrácia testovanej látky v pôde, ktorá spôsobí 50 percentnú (50 %) inhibíciu transformácie dusíka na nitrát.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Žiadne.

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Preosiata pôda sa doplní s práškovou rastlinnou múkou a buď sa ošetrí testovanou látkou, alebo sa ponechá bez ošetrenia (kontrola). Ak sa testujú agrochemikálie, odporúčajú sa minimálne dve testované koncentrácie a tieto koncentrácie sa vyberú vzhľadom na najvyššiu koncentráciu predpokladanú v teréne. Po 0, 7, 14 dňoch a 28 dňoch inkubácie sa vzorky ošetrených a kontrolných pôd extrahujú vo vhodnom rozpúšťadle a stanovia sa množstvá nitrátu v extraktoch. Miera tvorby nitrátu v ošetrených vzorkách sa porovná s mierou v kontrolách a vypočíta sa percentuálna odchýlka ošetrenej vzorky od kontroly. Všetky testy prebiehajú aspoň 28 dní. Ak sú na 28. deň rozdiely medzi ošetrenými a neošetrenými pôdami rovnaké alebo väčšie ako 25 %, merania pokračujú do maximálne 100 dní. Ak sa testujú iné látky ako agrochemikálie, testovaná látka sa pridá v sérii koncentrácií do vzoriek pôdy a zmerajú sa množstvá nitrátu, ktorý sa vytvorí v ošetrených a kontrolných vzorkách po 28 dňoch inkubácie. Výsledky z testov s viacerými rozdielnymi koncentráciami sa analyzujú s použitím regresného modelu a vypočítajú sa hodnoty EC_X (t. j. EC_{50}, EC_{25} a/alebo EC_{10}). Pozri definície.

1.5. VALIDITA TESTU

Hodnotenia výsledkov testu s agrochemikáliami sa zakladajú na relatívne malých rozdieloch (t. j. priemerná hodnota ± 25 %) medzi koncentráciami nitrátu v kontrolných a ošetrených vzorkách pôdy, takže veľké odchýlky v kontrolách môžu viesť k nesprávnym výsledkom. Z tohto dôvodu odchýlka medzi paralelnými kontrolnými vzorkami má byť menšia ako ± 15 %.

▼B

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. **Aparatúra**

Používajú sa testovacie nádoby, vyrobené z chemicky inertného materiálu. Mali by mať vhodný objem v súlade s postupom, použitým na inkubáciu pôd, t. j. hromadná inkubácia alebo séria jednotlivých vzoriek pôdy (pozri oddiel 1.7.1.2). Je potrebné venovať pozornosť minimalizovaniu strát vody, a aj tomu, aby sa počas testu umožnila výmena plynov (napr. testovacie nádoby sa môžu zakryť perforovanou polyetylénovou fóliou). Keď sa testujú prchavé látky, použijú sa nádoby, ktoré sa dajú utesniť a plynotesné nádoby. Tieto majú mať takú veľkosť, aby mohli byť asi do jednej štvrtiny svojho objemu vyplnené vzorkou pôdy.

Používa sa bežné laboratórne zariadenie vrátane:

— miešacieho zariadenia: mechanická miešačka alebo rovnocenné zariadenie,

— odstredivky (3 000 g) alebo filtračného zariadenia (s beznitrátovým filtračným papierom),

— prístroj s vhodnou citlivosťou reprodukovateľnosťou na analýzu nitrátu.

1.6.2. **Výber a počet pôd**

Použije sa jediná pôda. Odporúčané charakteristiky pôdy sú tieto:

— obsah piesku: nie menej ako 50 % a nie viac ako 75 %,

— pH: 5,5 – 7,5,

— obsah organického uhlíka: 0,5 – 1,5 %,

— stanoví sa mikrobiálna biomasa (8), (9) a obsah uhlíka v nej má byť aspoň 1 % celkového organického uhlíka v pôde.

Vo väčšine prípadov pôda s týmito charakteristikami predstavuje najhorší prípad, ktorý môže nastať, pretože adsorpcia testovanej chemikálie je minimálna a jej dostupnosť pre mikroflóru je maximálna. Následne nie sú vo všeobecnosti potrebné testy s inými pôdami. Za určitých okolností však, t. j. ak sa predpokladá hlavné použitie testovanej látky v konkrétnych pôdach, ako sú kyslé lesné pôdy, alebo v prípade elektrostaticky nabitých chemikálií, môže byť potrebné použiť ďalšiu pôdu.

▼B

1.6.3. **Odber a skladovanie vzoriek pôdy**

1.6.3.1. *Odber*

Potrebné sú podrobné informácie o histórii miesta v teréne, odkiaľ sa testovaná pôda odobrala. Uvádza sa presná poloha, porast, dátumy ošetrení výrobkami na ochranu rastlín, ošetrenia organickými a anorganickými hnojivami, prídavky biologických materiálov alebo náhodné kontaminácie. Miesto, vybraté na odber pôdy, má byť také, aby umožňovalo dlhodobé použitie. Stále pasienky, polia s ročnými plodinami (okrem kukurice) alebo husto zasiate rastliny na zelené hnojivo sú vhodné. Vybraté miesto na odber sa nesmie ošetrovať výrobkami na ochranu rastlín minimálne jeden rok pred odberom. Aspoň šesť mesiacov sa nesmie použiť ani žiadne organické hnojivo. Použitie minerálneho hnojiva je prijateľné iba v prípade, ak sa v súlade s požiadavkami na vzorky plodín a vzoriek pôdy neodoberú skôr ako minimálne tri mesiace po aplikácii hnojiva. Je potrebné vyhnúť sa použitiu pôdy ošetrenej hnojivami so známymi biocídnymi účinkami (napr. kyanamid vápenatý).

Vzorky by sa nemali odoberať počas alebo bezprostredne po dlhých obdobiach (viac ako 30 dní) sucha alebo nadmernej vlahy. Vzorky ornej pôdy odoberajú z hĺbky 0 až 20 cm. Pre vzorky pôdy z pastvín (lúk) alebo iných pôd, ktoré sa dlhšiu dobu neorú (aspoň jedno vegetačné obdobie), môže byť maximálna hĺbka odberu vzoriek o niečo väčšia ako 20 cm (napr. 25 cm).

Vzorky pôdy sa prepravujú v nádobách a za teplotných podmienok, ktoré zaručujú, že sa pôvodné vlastnosti pôdy významne nezmenia.

1.6.3.2. *Uchovávanie*

Uprednostňuje sa použitie čerstvo odobratých pôd z terénu. Ak nie je možné vyhnúť sa skladovaniu v laboratóriu, pôdy sa môžu skladovať v tme pri 4 ± 2 °C najviac tri mesiace. Počas uchovávania vzoriek sa musia zabezpečiť aeróbne podmienky. Ak sa pôdy odoberajú z oblastí, kde sú zamrznuté aspoň tri mesiace do roka, môže sa uvažovať o skladovaní šesť mesiacov pri mínus 18 °C až mínus 22 °C. Pred každým pokusom sa stanoví mikrobiálna biomasa skladovaných pôd a uhlík v biomase by mal tvoriť aspoň 1 % z celkového obsahu organického uhlíka v pôde (pozri oddiel 1.6.2).

1.6.4. **Manipulácia a príprava pôdy na test**

1.6.4.1. *Preinkubácia*

Ak sa pôda skladuje (pozri oddiel 1.6.3.2), odporúča sa preinkubácia v trvaní medzi 2 a 28 dňami. Teplota a obsah vlhkosti pôdy počas preinkubácie by mali byť rovnaké, ako sú tie, ktoré sa použijú v teste (pozri oddiely 1.6.4.2 a 1.7.1.3).

▼B

1.6.4.2. *Fyzikálno-chemické charakteristiky*

Pôda sa ručne zbaví veľkých predmetov (napr. kameňov, častí rastlín atď.) a potom sa vlhká preoseje tak, aby sa príliš nevysušila, na veľkosť častíc menšiu alebo rovnajúcu sa 2 mm. Obsah vlhkosti vzorky pôdy sa nastaví destilovanou alebo deionizovanou vodou na hodnotu medzi 40 % a 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody.

1.6.4.3. *Obohatenie organickým substrátom*

Pôda sa obohatí vhodným organickým substrátom, napr. práškovou múkou z lucerny-trávy-zeleného krmiva (hlavná zložka: *Medicago sativa*) s pomerom C/N medzi 12/1 a 16/1. Odporúčaný pomer lucerna – pôda je 5 g lucerny na kilogram pôdy (suchá hmotnosť).

1.6.5. **Príprava testovanej látky na aplikáciu do pôdy**

Testovaná látka sa zvyčajne aplikuje s použitím nosiča. Nosičom môže byť voda (pre látky rozpustné vo vode) alebo inertná tuhá látka ako napr. jemný kremenný piesok (veľkosť častíc: 0,1 – 0,5 mm). Kvapalné nosiče, ktoré sú iné ako voda (napr. organické rozpúšťadlá ako acetón, chloroform), by sa nemali používať, lebo môžu poškodzovať mikroflóru. Ak sa ako nosič použije piesok, môže byť pokrytý testovanou látkou, ktorá je rozpustená alebo suspendovaná vo vhodnom rozpúšťadle. V takýchto prípadoch sa rozpúšťadlo pred zmiešaním s pôdou odparí. Pre optimálnu distribúciu testovanej látky v pôde sa odporúča pomer 10 g piesku na kilogram pôdy (suchá hmotnosť). Kontrolné vzorky sa ošetria iba rovnakým množstvom vody a/alebo kremenného piesku.

Pri testovaní prchavých chemikálií je potrebné pokiaľ možno zabrániť stratám počas ošetrenia a pokúsiť sa o zabezpečenie homogénnej distribúcie v pôde (napr. testovaná látka sa na niekoľkých miestach vstrekne do pôdy).

1.6.6. **Testované koncentrácie**

Pri testovaní agrochemikálií by sa mali použiť aspoň dve koncentrácie. Nižšia koncentrácia by mala zohľadňovať prinajmenšom očakávané maximálne množstvo, ktoré sa dostane do pôdy za zvyčajných okolností v praxi, pričom vyššia koncentrácia by mala byť násobkom nižšej koncentrácie. Koncentrácie testovanej látky, pridanej do pôdy, sa vypočítajú za predpokladu jednotného zabudovania do hĺbky 5 cm a objemovej hmotnosti pôdy 1,5. V prípade agrochemikálií, ktoré sa aplikujú priamo do pôdy, alebo v prípade chemikálií, pre ktoré sa dá predpovedať množstvo, ktoré sa dostatne do pôdy, odporúčané testované koncentrácie sú maximálne predpovedané environmentálne koncentrácie [Predicted Environmental Concentration (PEC)] a päťnásobok týchto koncentrácií. Látky, pri ktorých sa očakáva, že sa budú aplikovať do pôd niekoľkokrát za sezónu, sa testujú s koncentráciami, ktoré sa stanovia vynásobením PEC maximálnym predpokladaným počtom aplikácií. Horná testovaná koncentrácia by však nemala prekročiť desaťnásobok maximálnej jednorazovej aplikačnej dávky. Ak sa testujú iné látky ako agrochemikálie, použije sa geometrický rad s aspoň piatimi koncentráciami. Testované koncentrácie by mali byť v rozsahu potrebnom na stanovenie hodnôt EC_x.

▼B

1.7. VYKONANIE TESTU

1.7.1. **Podmienky expozície**

1.7.1.1. *Ošetrenie a kontrola*

Pri testovaní agrochemikálií sa pôda rozdelí do troch dávok s rovnakou hmotnosťou. Dve dávky sa zmiešajú s nosičom, ktorý obsahuje produkt, a ďalšia sa zmieša s nosičom bez produktu (kontrola). Odporúčajú sa minimálne tri paralelné vzorky pre ošetrené a aj neošetrené pôdy. Pri testovaní iných látok ako agrochemikálií sa pôda rozdelí do šiestich dávok s rovnakou hmotnosťou. Päť vzoriek sa zmieša s nosičom, ktorý obsahuje testovanú látku, a šiesta vzorka sa zmieša s nosičom bez chemikálie. Odporúčajú sa tri paralelné vzorky pre ošetrené a aj kontrolné vzorky. Je potrebné venovať pozornosť zabezpečeniu homogénnej distribúcie testovanej látky v ošetrených vzorkách pôdy. Počas zmiešavania je potrebné zabrániť, aby sa pôda ubila, alebo sa vytvorili hrudky.

1.7.1.2. *Inkubácia vzoriek pôdy*

Inkubácia vzoriek pôdy sa môže vykonať dvomi spôsobmi: ako hromadné vzorky každej ošetrenej a neošetrenej pôdy alebo série jednotlivých a rovnako veľkých čiastočných vzoriek každej ošetrenej a neošetrenej pôdy. Ak sa však testujú prchavé látky, test sa uskutoční len so sériou jednotlivých čiastočných vzoriek. Ak sa pôdy inkubujú hromadne, pripravujú sa veľké množstvá ošetrenej a neošetrenej pôdy a čiastočné vzorky, ktoré sa majú analyzovať, sa odoberú podľa potreby počas testu. Množstvo pripravené na začiatku pre každé ošetrenie a kontrolu závisí od veľkosti čiastočných vzoriek, počtu paralelných vzoriek použitých na analýzu a predpokladaného maximálneho počtu odberov vzoriek. Pôdy inkubované hromadne sa dôkladne premiešajú pred odberom čiastočných vzoriek. Ak sa pôdy inkubujú ako séria jednotlivých vzoriek pôdy, každá ošetrená a neošetrená hromadne inkubovaná pôda sa rozdelí do požadovaného počtu čiastočných vzoriek a tieto vzorky sa použijú podľa potreby. V pokusoch, pri ktorých sa predpokladajú viac ako dva odbery, sa pripraví dostatočný počet čiastočných vzoriek, aby sa zohľadnili všetky paralelné vzorky a odbery. Aspoň tri paralelné vzorky testovanej pôdy by sa mali inkubovať za aeróbnych podmienok. Počas všetkých testov by sa mali použiť vhodné nádoby s dostatočnou plynnou fázou, aby sa zabránilo vytvoreniu anaeróbnych podmienok. Ak sa testujú prchavé látky, test sa uskutoční len so sériou jednotlivých čiastočných vzoriek.

1.7.1.3. *Podmienky testu a trvanie*

Test sa uskutočňuje v tme pri teplote miestnosti 20 ± 2 °C. Obsah vlhkosti vzoriek pôdy by sa mal počas testu zachovať medzi 40 % a 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody v pôde (pozri oddiel 1.6.4.2) s rozpätím ± 5 %. Podľa potreby sa môže pridať destilovaná, deionizovaná voda.

Minimálne trvanie testu je 28 dní. Pri testovaní agrochemikálií sa porovnáva miera tvorby nitrátu v ošetrených a kontrolných vzorkách. Ak sa odlišujú o viac ako 25 % na 28. deň, test pokračuje, pokiaľ sa nedosiahne rozdiel rovný alebo menší ako 25 %, alebo maximálne 100 dní, podľa toho, čo je kratšie. V prípade iných látok ako agrochemikálie sa test ukončí po 28 dňoch. Na 28. deň sa množstvá nitrátu v ošetrených a kontrolných vzorkách pôdy stanovia a vypočítajú sa hodnoty EC_x.

▼B

1.7.2. **Odber vzoriek a analýza pôd**

1.7.2.1. *Harmonogram odberu vzoriek*

Pri testovaní agrochemikálií sa vzorky pôdy analyzujú na nitrát v dni 0, 7, 14 a 28. Ak je potrebný predĺžený test, uskutočnia sa po 28. dni ďalšie merania v 14-denných intervaloch.

Ak sa testujú iné látky ako agrochemikálie použije sa aspoň päť testovaných koncentrácií a vzorky pôdy sa analyzujú na nitrát na začiatku (deň 0) a na konci expozície (28 dní). Ak sa to pokladá za potrebné, môže sa pridať napr. na siedmy deň prechodné meranie. Údaje získané na 28. deň sa použijú na stanovenie hodnoty EC_x pre chemikáliu. V prípade potreby sa môžu použiť v správe o počiatočnom množstve nitrátu v pôde údaje kontrolných vzoriek z dňa 0.

1.7.2.2. *Analýza vzoriek pôdy*

Množstvo nitrátu, ktoré sa vytvorí v každej ošetrenej a kontrolnej paralelnej vzorke, sa stanoví pri každom odbere. Nitrát sa extrahuje z pôdy pretrepávaním vzoriek s vhodným extrakčným činidlom, napr. 0,1 M roztokom chloridu draselného. Odporúča sa pomer 5 ml KCl na gram suchého hmotnostného ekvivalentu pôdy. Na optimalizáciu extrakcie by mali byť nádoby, v ktorých sa nachádza pôda a extrakčné činidlo, naplnené najviac do polovice. Zmesi sa pretrepávajú 60 minút pri 150 otáčkach za minútu (rpm). Zmesi sa odstreďujú alebo prefiltrujú a kvapalné fázy sa analyzujú na nitrát. Kvapalné extrakty, ktoré neobsahujú častice, sa môžu skladovať pred analýzou pri mínus 20 ± 5 °C do šiestich mesiacov.

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Ak sa test uskutočňuje s agrochemikáliami, množstvo nitrátu, ktoré sa vytvorí v každej paralelnej vzorke pôdy, sa zaznamená a priemerné hodnoty všetkých paralelných vzoriek sa uvedú v podobe tabuliek. Miera transformácie dusíka sa vyhodnotí vhodnými a všeobecne uznávanými štatistickými metódami (napr. F-test, 5 % úroveň významnosti). Množstvá vytvoreného nitrátu v mg nitrátu/kg suchej hmotnosti pôdy/deň. Miera tvorby nitrátu v každej ošetrenej vzorke sa porovná s kontrolnou vzorkou a vypočíta sa percentuálna odchýlka od kontrolnej vzorky.

Ak sa test uskutočňuje s inými látkami ako agrochemikáliami, stanoví sa množstvo vytvoreného nitrátu v každej paralelnej vzorke a krivka reakcie na dávku na stanovenie hodnôt EC_x. Množstvá nitrátu (t. j. mg nitrátu/kg suchej hmotnosti pôdy) zistené v ošetrených vzorkách po 28 dňoch sa porovná s množstvami zistenými v kontrole. Z týchto údajov sa vypočítajú hodnoty inhibície v percentuálnom vyjadrení pre každú testovanú koncentráciu. Tieto percentuálne hodnoty sa vynesú proti koncentrácii a potom sa použijú štatistické postupy na výpočet hodnôt ECX. Hranice spoľahlivosti ($p = 0,95$) pre vypočítané EC_x sa tiež stanovia s použitím štandardných postupov (10), (11), (12).

Testované látky, ktoré obsahujú veľké množstvá dusíka, môžu prispieť k množstvám nitrátu vytvoreného počas testu. Ak sa tieto látky testujú pri vysokej koncentrácii (napr. chemikálie, pri ktorých sa predpokladá opakované používanie), musia sa zahrnúť do testu príslušné kontroly (t. j. pôda plus testovaná látka, ale bez rastlinnej múky). Údaje z týchto kontrol sa musia zohľadniť vo výpočtoch EC_x.

▼B

2.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Ak je pri hodnotení výsledkov z testov s agrochemikáliami rozdiel v miere tvorby nitrátu medzi nižším ošetrením (t. j. maximálna očakávaná koncentrácia) a kontrolou rovný alebo menší ako 25 % pri každom odbere vzoriek po dni 28, môže sa vyhodnotiť, že produkt nemá dlhodobý vplyv na transformáciu dusíka v pôdach. Pri hodnotení výsledkov testov s inými chemikáliami ako agrochemikáliami sa používajú hodnoty EC_{50}, EC_{25} a/alebo EC_{10}.

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Úplnú identifikáciu použitej pôdy, vrátane:

— geografických údajov o mieste (zemepisná šírka, dĺžka),

— informácie o histórii miesta (t. j. rastlinný porast, ošetrenia s výrobkami na ochranu rastlín, ošetrenia s hnojivami, náhodná kontaminácia atď.),

— štruktúra využitia (napr. poľnohospodárska pôda, les atď.),

— hĺbka odberu vzoriek (cm),

— obsah piesku/bahna/ílu (% suchej hmotnosti),

— pH (vo vode),

— obsah organického uhlíka (% suchej hmotnosti),

— obsah dusíka (% suchej hmotnosti),

— počiatočná koncentrácia nitrátu (mg nitrátu/kg suchej hmotnosti),

— kapacita výmeny katiónov (mmol/kg),

— mikrobiálna biomasa v percentách celkového organického uhlíka,

— údaje o metódach použitých na stanovenie každého parametra,

— všetky informácie týkajúce sa odberu a skladovania vzoriek pôdy,

— údaje o prípadnej preinkubácii pôdy.

Testovaná látka:

— fyzikálny charakter a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti,

— chemické identifikačné údaje, v prípade potreby vrátane štruktúrneho vzorca, čistoty (t. j. v prípade výrobkov na ochranu rastlín percento účinnej látky), obsah dusíka.

Substrát:

— zdroj substrátu,

— zloženie (t. j. múka z lucerny, múka z lucerny – trávy – zeleného krmiva),

— obsah uhlíka, dusíka (% suchej hmotnosti),

▼B

— veľkosť otvorov sita (mm).

Testovacie podmienky:

— údaje o obohatení pôdy organickým substrátom,

— počet použitých koncentrácií testovanej chemikálie a v prípade potreby zdôvodnenie vybratých koncentrácií,

— údaje o aplikácii testovanej látky do pôdy,

— inkubačná teplota,

— obsah vlhkosti v pôde na začiatku a počas testu,

— použitá metóda inkubácie pôdy (t. j. hromadná alebo ako séria jednotlivých čiastkových vzoriek),

— počet paralelných vzoriek,

— počet odberov,

— metóda použitá na extrakciu nitrátu z pôdy.

Výsledky:

— analytický postup a zariadenie použité na analýzu nitrátu,

— údaje vo forme tabuliek, vrátane jednotlivých a priemerných hodnôt pri stanovení nitrátu,

— odchýlka medzi paralelnými a kontrolnými vzorkami,

— vysvetlenie prípadných korekcií pri výpočtoch,

— percentuálna odchýlka v mierach tvorby nitrátu pri každom odbere alebo v prípade potreby hodnota EC_{50} s 95 % hranicou spoľahlivosti, iné EC_x (t. j. EC_{25} alebo EC_{10}) s intervalmi spoľahlivosti a graf krivky reakcie na dávku,

— štatistické spracovanie výsledkov,

— všetky informácie a pozorovania umožňujúce interpretáciu výsledkov.

4. **ODKAZY**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1 – 16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Bruxelles.

(5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality – Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: Soil Quality – Biological Methods.

▼B

(6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italie, 18 – 20 janvier 1995.

(7) ISO 10381-6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(8) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method.

(9) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.

(10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99 – 113.

(11) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(12) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.22. PÔDNE MIKROORGANIZMY: TRANSFORMAČNÝ TEST UHLÍKA

1. METÓDA

Táto metóda zodpovedá OECD TG 217 (2000).

1.1. ÚVOD

Táto testovacia metóda opisuje laboratórnu metódu, určenú na skúmanie dlhodobých potenciálnych účinkov chemikálií jednorazovej expozície výrobkami na ochranu rastlín, a prípadne iných chemikálií, na aktivitu pôdnych mikroorganizmov transformovať uhlík. Test sa v podstate zakladá odporúčaniach Organizácie na ochranu rastlín v Európe a stredomorskej oblasti (1). Zohľadnili sa aj ďalšie usmernenia ako German Biologische Bundesanstalt (2), US Environmental Protection Agency (3) a SETAC (4). OECD workshop o výbere pôd/sedimentov, ktorý sa konal v Belgirate, Taliansko, v roku 1995 (5) sa dohodol na množstve a type pôd používaných v tomto teste. Odporúčania pre odoberanie, manipuláciu a skladovanie vzoriek pôdy sa zakladajú na Usmerňovacom dokumente ISO (6) a odporúčaniach z workshopu v Belgirate.

Pri posudzovaní a hodnotení toxických vlastností testovaných látok sa môže vyžadovať stanovenie účinkov na mikrobiálnu aktivitu pôdy, napr. keď sa vyžadujú údaje o potenciálnych vedľajších účinkoch výrobkov na ochranu rastlín na pôdnu mikroflóru, alebo ak sa predpokladá expozícia pôdnych mikroorganizmov iným chemikáliám, ako sú výrobky na ochranu rastlín. Test transformácie uhlíka sa vykonáva na stanovenie účinkov takýchto chemikálií na pôdnu mikroflóru. Ak sa testujú agrochemikálie (napr. výrobky na ochranu rastlín, hnojivá, chemikálie používané v lesnom hospodárstve) vykonáva sa test transformácie uhlíka a aj test transformácie dusíka. Ak sa testujú iné látky ako agrochemikálie, test transformácie dusíka je postačujúci. Ak však hodnoty EC_{50} testu transformácie dusíka pre takéto chemikálie sú v rozsahu zistenom pre komerčne dostupné inhibitory nitrifikácie (napr. nitrapyrín), na získanie ďalších informácií sa môže vykonať test transformácie uhlíka.

Pôdy pozostávajú zo živých a neživých zložiek, ktoré existujú v komplexných a heterogénnych zmesiach. Mikroorganizmy zohrávajú významnú úlohu pri rozkladaní a transformácii organických látok v úrodných pôdach, pričom mnohé druhy prispievajú k rôznym aspektom úrodnosti pôdy. Každý dlhodobý vplyv na tieto biochemické procesy by mohol potenciálne narušiť obeh živín a to by mohlo ovplyvniť úrodnosť pôdy. Transformácia uhlíka a dusíka sa vyskytuje vo všetkých úrodných pôdach. Aj keď sa mikrobiálne populácie, zodpovedné za tieto procesy, odlišujú v prípade jednotlivých pôd, cesty transformácie sú v podstate rovnaké.

▼B

Táto testovacia metóda je určená na stanovenie dlhodobých nepriaznivých účinkov látky na proces transformácie uhlíka v aeróbnych povrchových pôdach. Tento test je citlivý na zmeny veľkosti a aktivity mikrobiálnych populácií, zodpovedných za transformáciu uhlíka, keďže vystavuje tieto populácie pôsobeniu chemikálií a nedostatku uhlíka. Používa sa piesková pôda, chudobná na organické látky. Táto pôda sa ošetrí testovanou látkou a inkubuje za podmienok, ktoré umožňujú rýchly mikrobiálny metabolizmus. Za týchto podmienok sa zdroje ľahko dostupného uhlíka v pôde rýchlo spotrebujú. Toto spôsobí nedostatok uhlíka, ktoré zabíja mikrobiálne bunky a vyvoláva latentný stav a/alebo sporuláciu. Ak test prebieha viac ako 28 dní, súhrn týchto reakcií sa môže stanoviť v kontrolách (neošetrenej pôdy) ako progresívna strata metabolicky aktívnej biomasy (7). Ak na biomasu v pôde vystavenú nedostatku uhlíka, v podmienkach testu pôsobí prítomnosť chemikálie, nemusí sa vrátiť na rovnakú úroveň ako kontrola. A preto narušenie spôsobené testovanou látkou kedykoľvek počas testu bude často pretrvávať do konca testu.

Testy, z ktorých sa táto testovacia metóda vyvinula, boli prednostne určené pre látky, pri ktorých sa dá predpokladať množstvo, ktoré sa dostane do pôdy. Napríklad v prípade výrobkov na ochranu rastlín, pri ktorých je známa aplikačná dávka v teréne. V prípade agrochemikálií je testovanie dvoch dávok, ktoré zodpovedajú predpokladanej alebo predpovedanej aplikačnej dávke, dostačujúce. Agrochemikálie sa môžu testovať ako aktívne zložky (a.z.) ako zložené výrobky. Test však sa však obmedzuje na chemikálie s predvídateľnými environmentálnymi koncentráciami. Zmenením množstva testovanej látky aplikovanej na pôdu a spôsobu, akým sa údaje vyhodnocujú, sa test môže použiť aj na chemikálie, v prípade ktorých nie je známe predpokladané množstvo, ktoré sa dostane do pôdy. A tým sa pri iných chemikáliách ako agrochemikálie stanovia účinky série koncentrácií na transformáciu uhlíka. Údaje z týchto testov sa použijú na prípravu krivky vzťahu medzi dávkou a reakciou a vypočítajú sa hodnoty EC_x, kde x je definované ako účinok v percentuálnom vyjadrení.

1.2. DEFINÍCIE

Transformácia uhlíka: je degradácia organickej látky mikroorganizmami na anorganický konečný produkt oxid uhličitý.

EC_x (Efektívna koncentrácia): je koncentrácia testovanej látky v pôde, ktorá spôsobí x percentnú inhibíciu transformácie uhlíka na oxid uhličitý.

EC_{50} (Stredná efektívna koncentrácia): je koncentrácia testovanej látky v pôde, ktorá spôsobí 50 percentnú inhibíciu transformácie uhlíka na oxid uhličitý.

1.3. REFERENČNÉ LATKY

Žiadne.

▼B

1.4. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Preosiata pôda sa ošetrí testovanou látkou, alebo sa ponechá bez ošetrenia (kontrola). Ak sa testujú agrochemikálie, odporúčajú sa minimálne dve testované koncentrácie a tieto koncentrácie sa vyberú vo vzťahu k najvyššej koncentrácii predpokladanej v teréne. Po 0., 7., 14. a 28. dni inkubácie sa vzorky ošetrených a kontrolných pôd zmiešajú s glukózou a merajú sa glukózou indukované rýchlosti respirácie po sebe nasledujúcich 12 hodín. Rýchlosti respirácie sa vyjadrujú ako uvoľnený oxid uhličitý (mg oxidu uhličitého/kg suchej pôdy/h) alebo spotrebovaný kyslík (mg kyslíka/kg pôdy/h). Priemerná rýchlosť respirácie vo vzorkách s ošetrenou pôdou sa porovná s pôdou v kontrole a vypočíta sa percentuálna odchýlka ošetrenej pôdy od kontroly. Všetky testy prebiehajú aspoň 28 dní. Ak na 28. deň sa rozdiely medzi ošetrenými a neošetrenými pôdami rovnajú alebo sú väčšie ako 25 %, merania pokračujú v 14 dňových intervaloch do maximálne 100 dní. Ak sa testujú iné chemikálie ako agrochemikálie, pridáva sa séria koncentrácií testovanej látky ku vzorkám pôdy a glukózou indukované rýchlosti respirácie (t. j. priemer množstiev vzniknutého oxidu uhličitého alebo spotrebovaného kyslíka) sa stanovia po 28 hodinách. Výsledky z testov zo série koncentrácií sa analyzujú s použitím regresného modelu a vypočítajú sa hodnoty EC_x (t. j. EC_{50}, EC_{25} a/alebo EC_{10}). Pozri definície.

1.5. VALIDITA TESTU

Hodnotenia výsledkov testu s agrochemikáliami sa zakladajú na relatívne malých rozdieloch (t. j. priemerná hodnota ± 25 %) medzi uvoľneným oxidom uhličitým alebo spotrebovaným kyslíkom v (alebo prostredníctvom) kontrolných a ošetrených vzorkách pôdy, takže veľké odchýlky v kontrolách môžu viesť k nesprávnym výsledkom. Z tohto dôvodu odchýlka medzi paralelnými kontrolnými vzorkami má byť menšia ako ± 15 %.

1.6. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.6.1. **Aparatúra**

Použijú sa testovacie nádoby, vyrobené z chemicky inertného materiálu. Mali by mať vhodný objem v súlade s postupom použitým na inkubáciu pôd, t. j. hromadná inkubácia alebo séria jednotlivých vzoriek pôdy (pozri oddiel 1.7.1.2). Je potrebné venovať pozornosť tomu, aby sa minimalizovali straty vody, a aj tomu, aby sa počas testu umožnila výmena plynov (napr. testovacie nádoby sa môžu zakryť perforovanou polyetylénovou fóliou). Keď sa testujú prchavé látky, použijú sa nádoby, ktoré je možné utesniť a plynotesné nádoby. Tieto nádoby by mali mať takú veľkosť, aby mohli byť asi do jednej štvrtiny svojho objemu vyplnené vzorkou pôdy.

Na stanovenie glukózou indukovanej respirácie sa vyžadujú inkubačné systémy a prístroje na meranie tvorby oxidu uhličitého alebo spotreby kyslíka. Príklady takýchto systémov a nástrojov sa nachádzajú v literatúre (8), (9), (10), (11).

1.6.2. **Výber a počet pôd**

Použije sa jediná pôda. Odporúčané charakteristiky pôdy sú tieto:

— obsah piesku: nie menej ako 50 % a nie viac ako 75 %;

▼B

— pH: 5,5 – 7,5;

— obsah organického uhlíka: 0,5 – 1,5 %;

— mikrobiálna biomasa sa zmeria (12), (13) a jej obsah uhlíka by mal byť aspoň 1 % celkového organického uhlíka v pôde.

Vo väčšine prípadov pôda s týmito charakteristikami predstavuje najhorší prípad, ktorý môže nastať, pretože adsorpcia testovanej chemikálie je minimálna a jej dostupnosť pre mikroflóru je maximálna. Následne nie sú vo všeobecnosti potrebné testy s inými pôdami. Za určitých okolností však, t. j. ak sa predpokladá hlavné použitie testovanej látky v konkrétnych pôdach, ako sú kyslé lesné pôdy, alebo v prípade elektrostaticky nabitých chemikálií, sa môže vyžadovať použitie ďalšej pôdy.

1.6.3. **Odber a skladovanie vzoriek pôdy**

1.6.3.1. *Odber*

K dispozícii by mali byť podrobné informácie o histórii miesta v teréne, odkiaľ sa testovaná pôda odobrala. Uvádza sa presná poloha, porast, dátumy ošetrení výrobkami na ochranu rastlín, ošetrenia organickými a anorganickými hnojivami, prídavky biologických materiálov alebo náhodné kontaminácie. Miesto, vybraté na odber pôdy, má byť také, aby umožňovalo dlhodobé použitie. Vhodné sú stále pasienky, polia s ročnými plodinami (okrem kukurice) alebo husto zasiate rastliny na zelené hnojivo. Vybraté miesto na odber sa nesmie ošetrovať výrobkami na ochranu rastlín minimálne jeden rok pred odberom. Aspoň šesť mesiacov sa nesmie použiť ani žiadne organické hnojivo. Použitie minerálneho hnojiva je prijateľné iba v prípade, ak je potrebné pre plodiny a vzorky pôdy sa neodoberú skôr ako aspoň tri mesiace po aplikácii hnojiva. Je potrebné vyhnúť sa použitiu pôdy ošetrenej hnojivami so známymi biocídnymi účinkami (napr. kyanamid vápenatý).

Vzorky sa neodoberajú počas dlhých období (viac ako 30 dní) sucha alebo nadmernej vlahy alebo bezprostredne po nich. Vzorky ornej pôdy odoberajú z hĺbky 0 až 20 cm. Pre vzorky pôdy z pastvín (lúk) alebo iných pôd, ktoré sa dlhšiu dobu neorú (aspoň jedno vegetačné obdobie), môže byť maximálna hĺbka odberu vzoriek o niečo väčšia ako 20 cm (napr. 25 cm). Vzorky pôdy sa prepravujú v nádobách a za teplotných podmienok, ktoré zaručujú, že sa pôvodné vlastnosti pôdy významne nezmenia.

1.6.3.2. *Uchovávanie*

Uprednostňuje sa použitie čerstvo odobratých pôd z terénu. Ak sa nedá zabrániť skladovaniu v laboratóriu, pôdy sa môžu skladovať v tme pri 4 ± 2 °C najviac tri mesiace. Počas uchovávania vzoriek sa musia zabezpečiť aeróbne podmienky. Ak sa pôdy odoberajú z oblastí, kde sú zamrznuté aspoň tri mesiace do roka, môže sa uvažovať o skladovaní šesť mesiacov pri mínus 18 °C. Pred každým pokusom sa stanoví mikrobiálna biomasa skladovaných pôd a uhlík v biomase má tvoriť aspoň 1 % celkového obsahu organického uhlíka v pôde (pozri oddiel 1.6.2).

▼B

1.6.4. **Manipulácia a príprava pôdy na test**

1.6.4.1. *Preinkubácia*

Ak sa pôda skladuje (pozri oddiely 1.6.4.2 a 1.7.1.3), odporúča sa preinkubácia v trvaní medzi 2 a 28 dňami. Teplota a obsah vlhkosti pôdy počas preinkubácie by mali byť rovnaké, ako sa použije v teste (pozri oddiely 1.6.4.2 a 1.7.1.3).

1.6.4.2. *Fyzikálno-chemické charakteristiky*

Pôda sa ručne zbaví veľkých predmetov (napr. kameňov, častí rastlín atď.) a potom sa vlhká preoseje tak, aby sa príliš vysušila, na veľkosť častíc menšiu alebo rovnajúcu sa 2 mm. Obsah vlhkosti vzorky pôdy sa nastaví destilovanou alebo deionizovanou vodou na hodnotu medzi 40 % a 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody.

1.6.5. **Príprava testovanej látky na aplikáciu do pôdy**

Testovaná látka sa zvyčajne aplikuje s použitím nosiča. Nosičom môže byť voda (pre látky rozpustné vo vode) alebo inertná tuhá látka ako napr. jemný kremenný piesok (veľkosť častíc: 0,1 – 0,5 mm). Kvapalné nosiče, ktoré sú iné ako voda (napr. organické rozpúšťadlá ako acetón, chloroform), by sa nemali používať, lebo môžu poškodzovať mikroflóru. Ak sa použije piesok ako nosič, môže byť pokrytý testovanou látkou rozpustenou alebo suspendovanou vo vhodnom rozpúšťadle. V takýchto prípadoch sa rozpúšťadlo pred zmiešaním s pôdou odparí. Pre optimálnu distribúciu testovanej látky v pôde sa odporúča pomer 10 g piesku na kilogram pôdy (suchá hmotnosť). Kontrolné vzorky sa ošetria iba rovnakým množstvom vody a/alebo kremenného piesku.

Pri testovaní prchavých chemikálií je potrebné zabrániť stratám počas ošetrenia a pokúsiť sa o zabezpečenie homogénnej distribúcie v pôde (napr. testovaná látka sa na niekoľkých miestach vstriekne do pôdy).

1.6.6. **Testované koncentrácie**

Ak sa testujú výrobky na ochranu rastlín alebo iné chemikálie s predvídateľnými environmentálnymi koncentráciami, použijú sa aspoň dve koncentrácie. Nižšia koncentrácia by mala zohľadňovať prinajmenšom očakávané maximálne množstvo, ktoré sa dostane do pôdy za zvyčajných okolností v praxi, pričom vyššia koncentrácia by mala byť násobkom nižšej koncentrácie. Koncentrácie testovanej látky pridanej do pôdy sa vypočítajú za predpokladu jednotného zabudovania do hĺbky 5 cm a objemovej hmotnosti pôdy 1,5. V prípade agrochemikálií, ktoré sa aplikujú priamo do pôdy, alebo v prípade chemikálií, pre ktoré sa dá predpovedať množstvo, ktoré sa dostane do pôdy, odporúčané testovacie koncentrácie sú maximálne predvídateľné environmentálne koncentrácie [Predictable Environmental Concentration (PEC)] a päťnásobok týchto koncentrácií. Látky, pri ktorých sa očakáva, že sa budú aplikovať do pôd niekoľkokrát za sezónu, sa testujú s koncentráciami, ktoré sa stanovia vynásobením PEC maximálnym predpokladaným počtom aplikácií. Horná testovaná koncentrácia by však nemala prekročiť desaťnásobok maximálnej jednorazovej aplikačnej dávky.

Ak sa testujú iné látky ako agrochemikálie, použije sa geometrický rad s aspoň piatimi koncentráciami. Odporúča sa, aby testované koncentrácie boli v rozsahu potrebnom na stanovenie hodnôt EC_x.

▼B

1.7. VYKONANIE TESTU

1.7.1. **Podmienky expozície**

1.7.1.1. *Ošetrenie a kontrola*

Pri testovaní agrochemikálií, sa pôda rozdelí do troch dávok s rovnakou hmotnosťou. Dve dávky sa zmiešajú s nosičom, ktorý obsahuje produkt a ďalšia sa zmieša s nosičom bez produktu (kontrola). Odporúčajú sa minimálne tri paralelné vzorky pre ošetrené a aj neošetrené pôdy. Pri testovaní iných látok ako agrochemikálií sa pôda rozdelí do šiestich dávok s rovnakou hmotnosťou. Päť vzoriek sa zmieša s nosičom obsahujúcim testovanú látku a šiesta vzorka sa zmieša s nosičom bez chemikálie. Odporúčajú sa tri paralelné vzorky pre ošetrené a aj kontrolné vzorky. Je potrebné venovať pozornosť zabezpečeniu homogénnej distribúcie testovanej látky v ošetrených vzorkách pôdy. Počas miešania je potrebné zabrániť, aby sa pôda ubila, alebo sa vytvorili hrudky.

1.7.1.2. *Inkubácia vzoriek pôdy*

Inkubácia vzoriek pôdy sa môže vykonať dvomi spôsobmi: ako hromadné vzorky každej ošetrenej a neošetrenej pôdy alebo série jednotlivých a rovnako veľkých čiastočných vzoriek každej ošetrenej a neošetrenej pôdy. Ak sa však testujú prchavé látky, test by sa mal uskutočniť len so sériou jednotlivých čiastočných vzoriek. Ak sa pôdy inkubujú hromadne, pripravujú sa veľké množstvá ošetrenej a neošetrenej pôdy a čiastočné vzorky, ktoré sa majú analyzovať, sa odoberú podľa potreby počas testu. Množstvo pripravené na začiatku pre každé ošetrenie a kontrolu závisí od veľkosti čiastočných vzoriek, počtu paralelných vzoriek použitých na analýzu a predpokladaného maximálneho počtu odberov vzoriek. Pôdy, inkubované hromadne, sa dôkladne premiešajú pred odberom čiastočných vzoriek. Ak sa pôdy inkubujú ako séria jednotlivých vzoriek pôdy, každá ošetrená a neošetrená hromadne inkubovaná pôda sa rozdelí do požadovaného počtu čiastočných vzoriek a tieto vzorky sa použijú podľa potreby. V experimentoch, pri ktorých sa predpokladá viac ako dva odbery, sa pripraví dostatočný počet čiastočných vzoriek, aby sa zohľadnili všetky paralelné vzorky a odbery. Odporúča sa, aby sa aspoň tri paralelné vzorky testovanej pôdy inkubovali za aeróbnych podmienok (pozri oddiel 1.7.1.1). Počas všetkých testov sa by sa mali použiť vhodné nádoby s dostatočnou plynnou fázou, aby sa zabránilo vytvoreniu anaeróbnych podmienok. Ak sa testujú prchavé látky, test sa by sa mal vykonať len so sériou jednotlivých čiastočných vzoriek.

1.7.1.3. *Podmienky testu a trvanie*

Test sa uskutočňuje v tme pri teplote miestnosti 20 ± 2 °C. Obsah vlhkosti vzoriek pôdy sa počas testu zachová medzi 40 % a 60 % maximálnej kapacity zadržiavania vody v pôde (pozri oddiel 1.6.4.2) s rozpätím ± 5 %. Podľa potreby sa môže pridať destilovaná, deionizovaná voda.

Minimálne trvanie testu je 28 dní. Pri testovaní agrochemikálií sa porovnajú množstvá uvoľneného oxidu uhličitého alebo spotrebovaného kyslíka v ošetrených a kontrolných vzorkách. Ak sa odlišujú o viac ako 25 % na 28. deň, test pokračuje, pokiaľ sa nedosiahne rozdiel, ktorý sa rovná alebo je menší ako 25 %, alebo maximálne 100 dní, podľa toho, čo je kratšie. Pri testovaní iných látok ako agrochemikálie sa test ukončí po 28 dňoch. Na 28. deň sa množstvá uvoľneného oxidu uhličitého alebo spotrebovaného kyslíka v ošetrených a kontrolných vzorkách pôdy stanovia a vypočítajú sa hodnoty EC_x.

▼B

1.7.2. **Odber vzoriek a analýza pôd**

1.7.2.1. *Harmonogram odberu vzoriek*

Pri testovaní agrochemikálií sa vzorky pôdy analyzujú na glukózou indukované rýchlosti respirácie v dni 0, 7, 14 a 28. Ak je potrebný predĺžený test, uskutočnia sa po 28. dni ďalšie merania v 14-denných intervaloch.

Ak sa testujú iné látky ako agrochemikálie, použije sa aspoň päť testovaných koncentrácií a vzorky pôdy sa analyzujú na glukózou indukovanú respiráciu na začiatku (deň 0) a na konci vymedzeného času expozície (28 dní). Ak sa to pokladá za potrebné, môže sa pridať napr. na 7. deň prechodné meranie. Údaje, získané na 28. deň, sa použijú na stanovenie hodnoty EC_x pre chemikáliu. Podľa potreby sa môžu použiť údaje kontrolných vzoriek z dňa 0 na odhad počiatočných množstiev metabolicky aktívnej biomasy v pôde (12).

1.7.2.2. *Meranie glukózou indukovaných rýchlostí respirácie*

Rýchlosť respirácie, indukovaná glukózou v každej ošetrenej a kontrolnej paralelnej vzorke, sa stanoví pri každom odbere. Vzorky pôdy sa zmiešajú s dostatočným množstvom glukózy, aby sa zistila okamžitá maximálna respiračná reakcia. Množstvo glukózy, potrebnej na zistenie maximálnej respiračnej reakcie z danej pôdy, sa môže stanoviť v predbežnom teste s použitím série koncentrácií glukózy (14). Pre pieskové pôdy s 0,5 – 1,5 % organického uhlíka, 2 000 mg až 4 000 mg glukózy na kg suchej hmotnosti pôdy je zvyčajne dostačujúce. Glukóza sa môže pomlieť na prášok s čistým kremenným pieskom (10 g piesku/kg suchej hmotnosti pôdy) a homogénne sa zmieša s pôdou.

Vzorky s pridanou glukózou sa inkubujú vo vhodnej aparatúre na stanovenie rýchlosti respirácie buď kontinuálne, každú hodinu, alebo každé dve hodiny (pozri oddiel 1.6.1) pri 20 ± 2 °C. Uvoľnený oxid uhličitý alebo spotrebovaný kyslík sa stanoví 12 po sebe nasledujúcich 12 hodín a merania sa začnú čo najskôr, t. j. do 1 až 2 hodín po pridaní glukózy. Celkové množstvá uvoľneného oxidu uhličitého alebo spotrebovaného kyslíka počas 12 hodín sa zmerajú a stanovia sa priemerné rýchlosti respirácie.

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Ak sa testujú agrochemikálie, množstvo uvoľneného oxidu uhličitého alebo spotrebovaného kyslíka v každej paralelnej vzorke pôdy sa zaznamená a priemerné hodnoty všetkých paralelných vzoriek sa uvedú v podobe tabuliek. Výsledky sa vyhodnotia vhodnými a všeobecne uznávanými štatistickými metódami (napr. F-test, 5 % úroveň významnosti). Rýchlosti respirácie indukovanej glukózou sa vyjadrujú v mg oxidu uhličitého/kg suchej hmotnosti pôdy/h alebo mg kyslíka/suchú hmotnosť pôdy/h. Priemerná hodnota miery tvorby oxidu uhličitého alebo priemerná hodnota miery spotrebovaného kyslíka sa porovná s hodnotami v kontrole a vypočíta sa percentuálna odchýlka od kontroly.

▼B

Ak sa test uskutočňuje s inými látkami ako agrochemikáliami, stanovia sa množstvá uvoľneného oxidu uhličitého a spotrebovaného kyslíka v každej paralelnej vzorke a vyhotoví sa krivka reakcie na dávku na stanovenie hodnôt EC_x. Rýchlosti respirácie indukovanej glukózou (t. j. mg oxidu uhličitého/kg suchej hmotnosti pôdy/h alebo mg kyslíka/suchú hmotnosť pôdy/h) zistené v ošetrených vzorkách po 28 dňoch sa porovnajú s hodnotami zistenými v kontrole. Z týchto údajov sa vypočítajú hodnoty inhibície v percentuálnom vyjadrení pre každú testovanú koncentráciu. Tieto percentuálne hodnoty sa vynesú proti koncentrácii a použijú sa štatistické postupy na výpočet hodnôt EC_x. Hranice spoľahlivosti (p = 0,95) pre vypočítané EC_x sa stanovia tiež s použitím štandardných postupov (15) (16) (17).

2.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Ak sa pri hodnotení výsledkov z testov s agrochemikáliami rozdiel v rýchlostiach respirácie medzi ošetrením s nižšími dávkami (t. j. maximálna očakávaná koncentrácia) a kontrolou rovná alebo je menší ako 25 % pri každom odbere vzoriek po dni 28, môže sa vyhodnotiť, že produkt nemá dlhodobý vplyv na transformáciu uhlíka v pôde. Pri hodnotení výsledkov testov s chemikáliami inými ako agrochemikáliami sa používajú hodnoty EC_{50}, EC_{25} a/alebo EC_{10}.

3. **PODÁVANIE SPRAV**

SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Úplnú identifikáciu použitej pôdy vrátane:

— geografických údajov o mieste (zemepisná šírka, zemepisná dĺžka),

— informácie o histórii miesta (t. j. rastlinný porast, ošetrenia s výrobkami na ochranu rastlín, ošetrenia s hnojivami, náhodná kontaminácia atď.),

— štruktúra využitia (napr. poľnohospodárska pôda, les atď.),

— hĺbka odberu vzoriek (cm),

— obsah piesku/bahna/ílu (% suchej hmotnosti),

— pH (vo vode),

— obsah organického uhlíka (% suchej hmotnosti),

— obsah dusíka (% suchej hmotnosti),

— kapacita výmeny katiónov (mmol/kg),

— počiatočná mikrobiálna biomasa v percentách celkového organického uhlíka,

— údaje o metódach použitých na stanovenie každého parametra,

— všetky informácie týkajúce sa odberu a skladovania vzoriek pôdy,

— údaje o prípadnej preinkubácii pôdy.

▼B

Testovaná látka:

— fyzikálny charakter a v prípade potreby fyzikálno-chemické vlastnosti,

— chemické identifikačné údaje, v prípade potreby vrátane štruktúrneho vzorca, čistoty (t. j. v prípade výrobkov na ochranu rastlín percento účinnej látky), obsahu dusíka.

Testovacie podmienky:

— údaje o obohatení pôdy organickým substrátom,

— počet použitých koncentrácií testovanej chemikálie a v prípade potreby zdôvodnenie vybratých koncentrácií,

— údaje o aplikácii testovanej látky do pôdy,

— inkubačná teplota,

— obsah vlhkosti pôdy na začiatku a počas testu,

— použitá metóda inkubácie pôdy (t. j. hromadná alebo ako séria jednotlivých čiastkových vzoriek),

— počet paralelných vzoriek,

— časy odberov.

Výsledky:

— metóda a zariadenie použité na meranie rýchlostí respirácie,

— údaje v podobe tabuliek, vrátane jednotlivých a priemerných hodnôt množstiev oxidu uhličitého alebo kyslíka,

— odchýlka medzi paralelnými a kontrolnými vzorkami,

— vysvetlenie prípadných korekcií pri výpočtoch,

— percentuálna odchýlka v glukózou indukovaných rýchlostiach respirácie pri každom odbere alebo v prípade potreby hodnota EC_{50} s 95 % hranicou spoľahlivosti, iné EC_x (t. j. EC_{25} alebo EC_{10}) s intervalmi spoľahlivosti a graf krivky reakcií na dávku,

— štatistické spracovanie výsledkov v prípade potreby,

— všetky informácie a pozorovania umožňujúce interpretáciu výsledkov.

4. **ODKAZY**

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1 – 16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1-1 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

▼B

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

(5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18 – 20 January 1995.

(6) ISO 10381-6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in „Pesticide Effects on Soil Microflora“. Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3: 45 – 60.

(8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in „Methods of Soil Analysis – Part 2: Chemical and Microbiological Properties“. Agronomy Monograph No 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41: 831 – 871.

(9) ISO 11266-1. (1993). Soil Quality – Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions.

(10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(11) Heinemeye, r O., Insam, H., Kaiser, E.A, and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. Plant and Soil, 116: 77 – 81.

(12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate induced respiration method.

(13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.

(14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenuber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig, 38: 113 – 120.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99 – 113.

(16) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(17) Finney D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

▼B

C.23. **AERÓBNA A ANAERÓBNA TRANSFORMÁCIA V PÔDE**

1. **METÓDA**

Táto testovacia metóda zodpovedá OECD TG 307 (2002).

1.1. ÚVOD

Táto testovacia metóda je založená na existujúcich usmerneniach (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Metóda opísaná v tejto testovacej metóde je navrhnutá na hodnotenie aeróbnej a anaeróbnej transformácie chemikálií v pôde. Experimenty sa vykonávajú na stanovenie i) miery transformácie testovanej látky a ii) charakteru a miery tvorby a rozkladu produktov transformácie, ktorým rastliny a pôdne organizmy môžu byť vystavené. Takéto štúdie sa vyžadujú pre chemikálie, ktoré sa priamo aplikujú to pôdy alebo ktoré sa môžu dostať do pôdneho prostredia. Výsledky takýchto laboratórnych štúdií sa môžu použiť aj na vypracovanie protokolov pre odbery a analýzy pre príslušné štúdie v teréne.

Aeróbne a anaeróbne štúdie s jedným typom pôdy sú zvyčajne dostačujúce na hodnotenie ciest transformácie (8) (10) (11). Miery transformácie sa stanovia aspoň v troch ďalších pôdach (8) (10).

Na workshope OECD o výbere pôd/sedimentov, ktorý sa konal v talianskom Belgirate v roku 1995 (10), sa dohodlo konkrétne množstvo a typ pôd používaných v tomto teste. Typy testovaných pôd by mali byť reprezentatívne pre environmentálne podmienky v mieste, kde dôjde k použitiu chemikálie alebo uvoľneniu. Napríklad chemikálie, ktoré sa môžu uvoľniť v subtropickom až tropickom podnebí, sa testujú s ferrasolmi alebo nitosolmi (FAO systém). Workshop vydal tiež odporúčania, založené na pokynoch ISO (15), týkajúce sa odberu, manipulácie a skladovania vzoriek pôdy. Používanie ryžových pôd sa v tejto metóde tiež posudzuje.

1.2. DEFINÍCIE

Testovaná látka: každá látka, či ide o východiskovú zlúčeninu alebo príslušné produkty transformácie.

Produkty transformácie: všetky látky, ktoré vzniknú z biotických alebo abiotických transformačných reakcií testovanej látky, vrátane CO_2 a produktov, ktoré sú vo viazaných rezíduách.

Viazané rezíduá:„Viazané rezíduá“ sú zlúčeniny v pôde, rastlinách alebo zvieratách, ktoré pretrvávajú po extrakcii v matrici vo forme východiskovej zlúčeniny alebo jej metabolitu(-ov)/produktov transformácie. Extrakčné metódy nemusia podstatne meniť samotné zlúčeniny alebo štruktúru matrice. Charakter väzby sa čiastočne dá objasniť extrakčnými metódami, ktorými sa mení matrica, a zložitými analytickými technikami. Doposiaľ sa týmto spôsobom identifikovali napríklad kovalentné iónové a sorpčné väzby, ako aj zadržiavanie. Vo všeobecnosti vznik viazaných rezíduí významne znižuje biologickú prístupnosť a dostupnosť (12) [upravené z IUPAC 1984 (13)].

Aeróbna transformácia: reakcie, ktoré sa vyskytujú v prítomnosti molekulárneho kyslíka (14).

▼B

Anaeróbna transformácia: reakcie, ktoré sa vyskytujú v neprítomnosti molekulárneho kyslíka (14).

Pôda: je zmes minerálnych a organických chemických zložiek, pričom organické chemické zložky obsahujú zlúčeniny s vysokým obsahom uhlíka a dusíka a s vysokými molekulovými hmotnosťami a s malými (prevažne mikro-) organizmami. Pôda sa môže spracovávať v dvoch stavoch:

a) nenarušená, ako sa vytvorila v priebehu času, v charakteristických vrstvách s rozličnými typmi pôdy;

b) narušená, ako sa zvyčajne nachádza v poľnohospodársky využívaných oblastiach alebo ako sa vyskytuje pri odbere vzoriek kopaním a použije v tejto testovacej metóde (14).

Mineralizácia: je úplná degradácia organickej zlúčeniny na CO_2 a H_2O v aeróbnych podmienkach a na CH_4, CO_2 a H_2O v anaeróbnych podmienkach. V súvislosti s touto testovacou metódou, ak sa používa zlúčenina označená ^{14}C, mineralizácia znamená rozsiahlu degradáciu, počas ktorej sa označený atóm uhlíka oxiduje za uvoľnenia príslušného množstva $^{14}CO_2$ (14).

Polčas: $t_{0,5}$ je čas, za ktorý sa transformuje 50 % testovanej látky, ak sa transformácia dá opísať kinetikou prvého rádu; je nezávislý od koncentrácie.

DT_{50} (Doba odbúrania 50): je čas, za ktorý sa koncentrácia testovanej látky zníži o 50 %; odlišuje sa od polčasu $t_{0,5}$, ak transformácia nepostupuje podľa kinetiky prvého rádu.

DT_{75} (Doba odbúrania 75): je čas, za ktorý sa koncentrácia testovanej látky zníži o 75 %.

DT_{90} (Doba odbúrania 90): je čas, za ktorý sa koncentrácia testovanej látky zníži o 90 %.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky sa použijú na charakterizáciu a/alebo identifikáciu produktov transformácie spektroskopickými a chromatografickými metódami.

1.4. POUŽITEĽNOSŤ TESTU

Metóda je použiteľná na všetky chemické látky (neoznačené alebo rádioaktívne označené), pre ktoré je k dispozícii analytická metóda s dostatočnou presnosťou a citlivosťou. Je použiteľná na mierne prchavé, neprchavé, vo vode rozpustné alebo vo vode nerozpustné zlúčeniny. Test sa nepoužíva na chemikálie, ktoré sú veľmi prchavé z pôdy (napr. fumiganty, organické rozpúšťadlá), a teda sa pri experimentálnych podmienkach testu nemôžu uchovať v pôde.

▼B

1.5. INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

Na meranie miery transformácie sa môže použiť neoznačená alebo označená testovaná látka. Označený materiál sa vyžaduje pri skúmaní ciest transformácie a pri stanovení hmotnostnej bilancie. Odporúča sa označenie pomocou ^{14}C, ale môže použiť aj označenie inými izotopmi, ako napr. ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. Značka sa umiestni pokiaľ možno v najstabilnejšej(-ích) časti(-iach) molekuly ([1]). Čistota testovanej látky by mala byť aspoň 95 %.

Pred uskutočnením testu aeróbnej a anaeróbnej transformácie v pôde sú potrebné tieto informácie o testovanej látke:

a) rozpustnosť vo vode (metóda A.6);

b) rozpustnosť v organických rozpúšťadlách;

c) tlak pár (metóda A.4) a Henryho konštanta;

d) rozdeľovací koeficient n-oktanol/voda (metóda A.8);

e) chemická stabilita v tme (hydrolýza) (metóda C.7);

f) pK_a, ak molekula podlieha protonácii alebo deprotonácii [usmernenie OECD 112] (16).

Ďalšie užitočné informácie môžu zahrnovať údaje o toxicite testovanej látky pre pôdne mikroorganizmy [testovacie metódy C.21 a C.22] (16).

Je potrebné mať k dispozícii analytické metódy (vrátane extrakčných a purifikačných metód) na kvantifikáciu a identifikáciu testovanej látky a jej produktov transformácie.

1.6. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Vzorky pôdy sa ošetria testovanou látkou a inkubujú v tme v bankách biometrického typu alebo v prietokových systémoch za kontrolovaných laboratórnych podmienok (pri konštantnej teplote a vlhkosti pôdy). Po príslušných časových intervaloch sa vzorky pôdy extrahujú a analyzujú na východziu látku a na produkty transformácie. Prchavé produkty sa tiež zhromaždia na analýzu s použitím príslušných absorpčných zariadení. S použitím materiálu označeného ^{14}C sa môžu merať rôzne miery mineralizácie testovanej látky zachytením uvoľneného $^{14}CO_2$ a môže sa stanoviť hmotnostná bilancia, vrátane tvorby viazaných rezíduí v pôde.

1.7. KRITÉRIÁ KVALITY

1.7.1. **Regenerácia**

Extrakcia a analýza minimálne dvoch paralelných vzoriek pôdy ihneď po pridaní testovanej látky poskytne prvý dôkaz reprodukovateľnosti analytickej metódy a rovnomerného rozdelenia testovanej látky pri aplikácii. Regenerácie v neskorších štádiách experimentov sú dané príslušnými hmotnostnými bilanciami. Regenerácie by mali byť v rozsahu od 90 % do 110 % pre označené chemikálie (8) a od 70 % do 110 % pre neoznačené chemikálie (3).

([1]) Napríklad, ak testovaná látka obsahuje jeden kruh, označenie tohto kruhu je potrebné; ak testovaná látka obsahuje dva alebo viac kruhov, môžu byť potrebné samostatné štúdie na hodnotenie osudu každého označeného kruhu a na získanie príslušných informácií o tvorbe produktov transformácie.

▼B

1.7.2. **Reprodukovateľnosť a citlivosť analytickej metódy**

Reprodukovateľnosť analytickej metódy (okrem účinnosti extrakcie v počiatočnom štádiu) na kvantifikovanie testovanej látky a produktov transformácie sa môže overiť paralelnou analýzou rovnakého extraktu pôdy inkubovaného dostatočne dlho, aby vznikli produkty transformácie.

Detekčný limit (LOD) analytickej metódy pre testovanú látku a pre produkty transformácie má byť aspoň 0,01 mg/kg pôdy (ako testovaná látka) alebo 1 % aplikovanej dávky, podľa toho ktorá hodnota je nižšia. Je potrebné stanoviť aj kvantifikačný limit (LOQ).

1.7.3. **Presnosť údajov o transformácii**

Regresná analýza koncentrácií testovanej látky v závislosti od času poskytuje príslušné informácie o spoľahlivosti transformačnej krivky a umožňuje výpočet hraníc spoľahlivosti pre polčasy (v prípade kinetiky pseudo prvého rádu) alebo hodnôt DT_{50} a v prípade potreby DT_{75} a DT_{90}.

1.8. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.8.1. **Prístroje a chemické reagencie**

Inkubačné systémy pozostávajú zo statických uzatvorených systémov alebo vhodných prietokových systémov (7) (17). Príklady vhodného prietokového prístroja na inkubáciu pôdy biometrického typu sú znázornené na obrázkoch 1 a 2. Obidva typy inkubačných systémov majú výhody a obmedzenia (7) (17).

Sú potrebné štandardné laboratórne prístroje, a osobitne tieto:

— analytické prístroje, ako napr. GLC-, HPLC-, TLC-zariadenie, vrátane vhodných detekčných systémov na analýzu rádioaktívne označených alebo neoznačených látok alebo inverzná izotopová zrieďovacia metóda,

— identifikačné prístroje (napr. MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR atď.),

— kvapalný scintilačný počítač,

— oxidačné činidlo na spaľovanie rádioaktívneho materiálu,

— odstredivka,

— extrakčný prístroj (napríklad centrifugačné kyvety na extrakciu za studena a Soxhletov extraktor na kontinuálnu refluxnú extrakciu),

— prístroje na zvýšenie koncentrácie roztokov a extraktov (napr. rotačná odparka);

— vodný kúpeľ,

— mechanická miešačka (napr. stroj na miesenie, rotačný mixér).

▼B

Použité chemické reagencie zahrnujú napríklad:

— NaOH, analytická kvalita, 2 mol/dm^3 alebo iná vhodná zásada (napr. KOH, etanolamín),

— H_2SO_4, analytická kvalita, 0,05 mol/dm^3,

— etylénglykol, analytická kvalita,

— tuhé absorpčné materiály, napr. nátronové vápno a polyuretánové zátky,

— organické rozpúšťadlá, analytická kvalita, napr. acetón, metanol atď.,

— scintilačná kvapalina.

1.8.2. **Aplikácia testovanej látky**

Aby sa testovaná mohla pridať do pôdy a distribuovať v nej, môže sa rozpustiť vo vode (deionizovanej alebo destilovanej) alebo v prípade potreby v minimálnych množstvách acetónu alebo iných organických rozpúšťadlách (6), v ktorých je testovaná látka dostatočne rozpustná a stabilná. Množstvo zvoleného rozpúšťadla by nemalo mať významný vplyv na mikrobiálnu aktivitu pôdy (pozri oddiely 1.5 a 1.9.2 – 1.9.3). Je potrebné zabrániť, aby sa používali rozpúšťadlá inhibujúce mikrobiálnu aktivitu, ako je chloroform, dichlórmetán a iné halogenované rozpúšťadlá.

Testovaná látka sa môže tiež pridať ako tuhá látka, napr. zmiešaná v kremennom piesku (6) alebo v malých čiastočných vzorkách pôdy, ktoré sa vysušia na vzduchu a sterilizujú. Ak sa testovaná látka pridá s použitím rozpúšťadla, rozpúšťadlo by sa malo odpariť predtým, ako sa čiastočná vzorka s pridanou látkou pridá k pôvodnej nesterilnej vzorke pôdy.

V prípade bežných chemikálií, ktoré sa dostávajú do pôdy najmä prostredníctvom splaškového kalu/aplikácie v poľnohospodárstve, sa testovaná látka najskôr pridá do kalu, ktoré sa potom aplikuje do vzorky pôdy. (pozri oddiely 1.9.2 a 1.9.3)

Použitie zložených produktov sa zvyčajne neodporúča. Použitie zloženého materiálu však môže byť vhodnou alternatívou, napríklad v prípade ťažko rozpustných testovaných látok.

1.8.3. **Pôdy**

1.8.3.1. *Výber pôdy*

Na stanovenie transformačnej cesty sa môže použiť reprezentatívna pôda; piesočnatá hlina alebo prachovitá (bahenná) hlina, alebo hlina alebo hlinitý piesok [podľa FAO a USDA klasifikácie (18)] s pH 5,5 – 8,0, s obsahom organického uhlíka 0,5 % – 2,5 % a mikrobiálnou biomasou s obsahom aspoň 1 % celkového organického uhlíka (10).

Pre štúdie miery transformácie sa použijú aspoň tri ďalšie pôdy predstavujúce rozsah relevantných pôd. Pôdy sa odlišujú v obsahu organického uhlíka, pH, obsahu ílu a mikrobiálnej biomasy (10).

▼B

Všetky pôdy by mali byť charakterizované aspoň týmito vlastnosťami textúry (% piesok, % bahno, % íl) [klasifikácia podľa FAO a USDA (18)], pH, katiónová výmenná kapacita, organický uhlík, objemová hmotnosť, charakteristika retencie vody ([1]) a mikrobiálna biomasa (iba pre aeróbne štúdie). Ďalšie informácie o vlastnostiach pôdy môžu byť užitočné pri interpretácii výsledkov. Na stanovenie charakteristík pôdy sa môžu použiť odporúčané metódy v odkazoch (19) (20) (21) (22) (23). Mikrobiálna biomasa sa stanoví s použitím metódy substrátom indukovanej respirácie (SIR) (25) (26) alebo alternatívnymi metódami (20).

1.8.3.2. *Odber, manipulácia a skladovanie pôd*

Potrebné sú podrobné informácie o histórii miesta v teréne, odkiaľ sa testovaná pôda odobrala. Uvádza sa presná poloha, porast, ošetrenia chemikáliami, ošetrenia organickými a anorganickými hnojivami, prídavky biologických materiálov alebo iné kontaminácie. Na štúdie transformácie sa nepoužijú pôdy, ktoré boli ošetrené testovanou látkou alebo jej štrukturálnymi analógmi v priebehu ostatných štyroch rokov (10) (15).

Pôda má byť čerstvo odobratá z terénu (z horizontu A alebo vrchnej 20 cm vrstvy) s obsahom vody v pôde, ktorý umožní preosiatie. V prípade iných pôd ako ryžové polia sa vzorky neodoberajú počas alebo bezprostredne po dlhých obdobiach (> 30 dní) sucha, mrazu alebo záplav (14). Vzorky sa dopravia tak, aby sa minimalizovali zmeny v obsahu vody v pôde a uchovávajú sa v tme za čo najväčšieho prístupu vzduchu. Na tento účel zvyčajne postačí voľne zaviazané polyetylénové vrecúško.

Pôda by sa mala spracovať čo najskôr po odbere vzoriek. Porast, väčšie kusy pôdnych živočíchov a kamene sa odstránia pred preosiatím cez 2 mm sito, ktorým sa odstránia malé kamienky, živočíchy a zvyšky rastlín. Je potrebné zabrániť nadmernému vysušeniu a rozdrveniu pôdy pred preosiatím (15).

Ak je ťažké odoberať vzorky v zime v teréne (zamrznutá pôda alebo pokrytá vrstvami snehu), môže sa odobrať zo šarže pôdy, uchovávanej v skleníku pod porastom (napr. tráva alebo zmes trávy a ďateliny). V každom prípade sa uprednostňujú štúdie s čerstvo odobratou pôdou z terénu, ale ak sa odobratá a spracovaná pôda musela skladovať pred začiatkom štúdie, musia sa dodržať vhodné skladovacie podmienky a iba na obmedzený čas (4 °C ± 2 °C maximálne tri mesiace), aby sa zachovala mikrobiálna aktivita ([2]). Podrobné pokyny na odber, manipuláciu a skladovanie pôd, ktoré sa použijú na biotransformačné pokusy sa nachádzajú v odkazoch (8) (10) (15) (26) (27).

([1]) Charakteristiku retencie vody v pôde je možné merať ako kapacitu poľa, ako kapacitu zadržiavania vody alebo ako sací tlak vody (pF). Na vysvetlenie pozri dodatok 1. V správe z testu je potrebné uviesť, či charakteristiky retencie vody a objemová hmotnosť pôd boli stanovené v nenarušených vzorkách z terénu alebo narušených (spracovaných) vzorkách.

([2]) Z výsledkov posledného výskumu vyplýva, že vzorky z miernych oblastí sa tiež môžu skladovať pri – 20 °C viac ako tri mesiace (28) (29) bez významných strát mikrobiálnej aktivity.

▼B

Predtým, ako sa spracovaná pôda použije v tomto teste, mala by sa podrobiť preinkubácii na umožnenie kĺčenia a odstránenia semien a na opätovné nastolenie rovnováhy mikrobiálneho metabolizmu po následnej zmene podmienok odberu alebo skladovania na podmienky inkubácie. Vo všeobecnosti je vhodná doba preinkubácie medzi 2 a 28 dňami za teplotných podmienok a vlhkosti približujúcej sa skutočnému testu (15). Čas skladovania a preinkubácie spolu nesmie trvať dlhšie ako tri mesiace.

1.9. VYKONANIE TESTU

1.9.1. **Testovacie podmienky**

1.9.1.1. *Teplota pri teste*

Počas celého obdobia testovania by sa pôdy mali inkubovať v tme pri konštantnej teplote, predstavujúcej klimatické podmienky, kde sa vyskytne použitie alebo uvoľnenie. Pre všetky testované látky, ktoré sa môžu dostať do pôdy v miernom podnebí, sa odporúča teplota 20 °C ± 2 °C. Teplota by sa mala sledovať.

V prípade chemikálií, aplikovaných alebo uvoľnených v chladnejšom podnebí (napr. v severných krajinách počas obdobia jesene/zimy), sa inkubujú ďalšie vzorky pôdy, ale pri nižšej teplote (napr. 10 °C ± 2 °C).

1.9.1.2. *Obsah vlhkosti*

V prípade testov transformácie v aeróbnych podmienkach sa obsah pôdnej vlhkosti ([1]) nastaví a zachová na pF medzi 2,0 a 2,5 (3). Obsah pôdnej vlhkosti sa vyjadruje ako hmotnosť vody na hmotnosť suchej pôdy a pravidelne sa kontroluje (napr. v 2-týždňových intervaloch) vážením v inkubačných bankách a straty vody sa doplnia pridaním vody (pokiaľ možno sterilnej filtrovanej vody z vodovodu). Je potrebné venovať pozornosť tomu, aby sa predchádzalo a minimalizovali straty testovanej látky a/alebo produktov transformácie vyparovaním a/alebo fotodegradáciou (ak sa vyskytuje) počas pridávania vlhkosti.

Pri testoch transformácie v anaeróbnych podmienkach a podmienkach ryžových polí sa pôda saturuje zaplavením.

1.9.1.3. *Aeróbne inkubačné podmienky*

V prietokových systémoch sa aeróbne podmienky zabezpečujú nekontinuálnym premývaním alebo kontinuálnou ventiláciou zvlhčeným vzduchom. V bankách biometrického typu sa vzduch zabezpečuje difúziou.

1.9.1.4. *Sterilné aeróbne podmienky*

Aby sa získali informácie o dôležitosti abiotickej transformácie testovanej látky vzorky, vzorky pôdy sa môžu sterilizovať [sterilizačné metódy pozri v odkazoch (16) a (29)], ošetriť sterilnou testovanou látkou (napr. pridaním roztoku cez sterilný filter) a prevzdušniť zvlhčeným sterilným vzduchom, ako je uvedené v oddiele 1.9.1.3. V prípade ryžových pôd sa pôda a voda sterilizujú a inkubácia sa uskutoční, ako je uvedené v oddiele 1.9.1.6.

([1]) Pôda nemá byť ani príliš mokrá, ani príliš suchá, aby sa zachovalo primerané prevzdušnenie a výživa pôdnej mikroflóry. Odporúčané vlhkosti pôdy pre optimálny mikrobiálny rast sú v rozsahu 40 % – 60 % kapacity zadržiavania vody (WHC) a od 0,1 bar – 0,33 bar (6). Posledný uvedený rozsah zodpovedá rozsahu pF 2,0 – 2,5. Typické obsahy vlhkostí rôznych typov pôdy sú uvedené v dodatku 2.

▼B

1.9.1.5. *Anaeróbne inkubačné podmienky*

Na zistenie a zachovanie anaeróbnych podmienok sa pôda, ošetrená testovanou látkou a inkubovaná za aeróbnych podmienok 30 dní alebo jeden polčas, alebo DT^{50} (podľa toho, ktoré je kratšie), potom zaleje vodou (1 cm – 3 cm vrstva vody) a do inkubačného systému sa vženie inertný plyn (napr. dusík alebo argón) ([1]). Testovací systém musí umožňovať merania, ako napr. pH, koncentrácia kyslíka a redox potenciál, a zapojenie zariadenia na zachytávanie prchavých produktov. Systém biomerického typu musí byť uzatvorený, aby nevnikol vzduch difúziou.

1.9.1.6. *Inkubačné podmienky ryžových polí*

Na štúdiu transformácie v ryžových pôdach sa pôda zaplaví 1 cm – 5 cm vrstvou vody a testovaná látka sa aplikuje do vodnej fázy (9). Odporúča sa hĺbka pôdy aspoň 5 cm. Systém sa prevzdušňuje vzduchom ako za aeróbnych podmienok. Sleduje sa a zaznamená pH, koncentrácia kyslíka a redox potenciál vodnej vrstvy. Pred začatím tranformačných štúdií je potrebná doba preinkubácie aspoň dva týždne (pozri oddiel 1.8.3.2).

1.9.1.7. *Trvanie testu*

Štúdie miery a cesty by nemali byť zvyčajne dlhšie ako 120 dní ([2]) [(3) (6) (8)], pretože potom sa dá očakávať pokles pôdnej mikrobiálnej aktivity s časom v neprirodzenom laboratórnom systéme izolovanom od prírodných revitalizačných procesov. Ak je potrebné charakterizovať rozklad testovanej látky a tvorbu a rozklad hlavných produktov transformácie, štúdie môžu pokračovať dlhšie obdobia (napr. 6 alebo 12 mesiacov) (8). Dlhšie inkubačné doby sa zdôvodnia v správach z testov a doložia sa k nim údaje z meraní biomasy počas týchto dôb a na ich konci.

1.9.2. **Vykonanie testu**

Približne 50 g až 200 g pôdy (vzťahuje sa na suchú hmotnosť) sa umiestni do každej inkubačnej banky (pozri obrázky 1 a 2 v dodatku 3) a pôda sa ošetrí testovanou látkou podľa jednej z metód uvedených v oddiele 1.8.2. Ak sa na aplikáciu testovanej látky používajú organické rozpúšťadlá, odstránia sa z pôdy odparením. Potom sa pôda dôkladne premieša tyčinkou a/alebo pretrepaním banky. Ak sa štúdia uskutočňuje v podmienkach ryžových polí, po aplikácii testovanej látky sa pôda a voda dôkladne premiešajú. Malé alikvótne časti (napr. 1 g) ošetrených pôd sa analyzujú na testovanú látku, aby sa overilo rovnomerné rozdelenie. Alternatívna metóda je uvedená ďalej.

([1]) Aeróbne podmienky prevládajú v povrchových pôdach a dokonca v podpovrchových pôdach, ako je uvedené vo výskumnom projekte, ktorý sponzoruje EÚ [K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270 – 277, 17 – 21. August 1992, Sigtuna, Sweden]. Anaeróbne podmienky sa môžu vyskytnúť iba príležitostne počas zaplavenia pôd po dlhotrvajúcich dažďoch alebo v podmienkach ryžových polí na poliach s ryžou.

([2]) Aeróbne štúdie by sa mohli ukončiť pred uplynutím 120 dní za predpokladu, že sa zreteľne dosiahne konečná cesta transformácie a konečná mineralizácia v tom čase. Ukončenie testu je možné po 120 dňoch, alebo keď sa aspoň 90 % testovanej látky transformuje, ale iba ak sa vytvorí aspoň 5 % CO_2.

▼B

Miera ošetrenia by mala zodpovedať najvyššej aplikačnej dávke výrobku na ochranu rastlín, odporúčanej v návode na použite, a rovnomernému zabudovaniu v zodpovedajúcej hĺbke v teréne [napr. vrchná 10 cm vrstva ([1]) pôdy]. Napríklad pre chemikálie, ktoré sa aplikujú na listy alebo na pôdu bez zabudovania, zodpovedajúca hĺbka pre výpočet, koľko chemikálie sa má pridať do každej banky, je 2,5 cm. Pre chemikálie, ktoré sa zabudujú do pôdy, je zodpovedajúca hĺbka presne uvedená v návode na použitie. Pre bežné chemikálie by sa aplikačná dávka mala odhadnúť na základe najvýznamnejšej cesty prieniku; napríklad, ak je hlavná cesta prieniku do pôdy cez splaškový kal, chemikália sa dávkuje do kalu pri koncentrácii, ktorá zodpovedá očakávanej koncentrácii kalu, a množstvo kalu pridaného do pôdy by malo zodpovedať bežnej aplikácii kalu, používanej na poľnohospodárske pôdy. Ak táto koncentrácia nie je na identifikáciu hlavných produktov transformácie dostatočne vysoká, môže byť užitočná inkubácia samostatných vzoriek pôdy s vyššou mierou ošetrenia, ale je potrebné zamedziť priveľkej miere ošetrenia ovplyvňujúcej mikrobiálne funkcie pôdy (pozri oddiely 1.5 a 1.8.2).

Alternatívne sa môže väčšia dávka (t. j. 1 kg až 2 kg) pôdy ošetriť testovanou látkou, dôkladne premiešať vo vhodnom miešacom zariadení a potom preniesť v malých dávkach 50 g až 200 g do inkubačných baniek (napríklad s použitím dávkovačov vzoriek). Malé alikvótne časti (napr. 1 g) ošetrenej pôdy sa analyzujú na testovanú látku, aby sa overilo rovnomerné rozdelenie. Uprednostňuje sa takýto postup, pretože umožňuje rovnomernejšie rozdelenie testovanej látky do pôdy.

Aj neošetrené vzorky pôdy sa inkubujú za rovnakých podmienok (aeróbne) ako vzorky ošetrené testovanou látkou. Tieto vzorky sa používajú na merania biomasy v priebehu štúdií a na ich konci.

Ak sa testovaná látka aplikuje do pôdy rozpustená v organickom(-ých) rozpúšťadle(-ách), vzorky pôdy ošetrené rovnakým množstvom rozpúšťadla(-iel) sa inkubujú za rovnakých podmienok (aeróbne) ako vzorky ošetrené testovanou látkou. Tieto vzorky sa používajú na stanovenia biomasy na začiatku štúdií, počas nich a na ich konci, na overenie účinkov rozpúšťadla(-iel) na mikrobiálnu biomasu.

Banky obsahujúce ošetrenú pôdu sa buď pripoja na prietokový systém opísaný na obrázku 1, alebo uzavrú absorpčnou kolónou znázornenou na obrázku 2 (pozri dodatok 3).

([1]) Výpočet počiatočnej koncentrácie v mieste s použitím tejto rovnice:

$$C_{soil}[mg/kg_{soil}] = \frac{A[kg/ha] \cdot 10^6[mg/kg]}{l[m] \cdot 10^4[m^2/ha] \cdot d\left[kg_{soil}/m^3\right]}$$

C_{soil} = počiatočná koncentrácia v pôde [mg/kg]

A = aplikačná dávka [kg/ha]; l = hrúbka pôdnej vrstvy poľa [m]; d = suchá objemová hmotnosť [kg/m^3].

Spravidla aplikačná dávka 1 kg/ha vytvára koncentráciu 1 mg/kg v 10 cm vrstve (pri objemovej hmotnosti 1 g/cm^3).

▼B

1.9.3. **Odber vzoriek a meranie**

V príslušných časových intervaloch sa odoberú paralelné inkubačné banky a vzorky pôdy sa extrahujú s príslušnými rozpúšťadlami rôznej polarity a analyzujú na testovanú látku a/alebo produkty transformácie. Vhodne zostavená štúdia zahrnuje dostatočný počet baniek tak, aby sa mohli odobrať dve banky pri každom odbere. Odoberajú sa aj absorpčné roztoky alebo tuhé absorpčné materiály v rôznych časových intervaloch (7-dňové intervaly v priebehu prvého mesiaca a po jednom mesiaci 17-dňové intervaly) počas inkubácie každej vzorky pôdy a na jej konci a analyzujú sa na prchavé produkty. Okrem vzorky pôdy odobratej priamo po aplikácii (vzorka z nultého dňa) je potrebné naplánovať aspoň 5 ďalších termínov odberu. Časové intervaly sa zvolia tak, aby sa dala stanoviť schéma rozkladu testovanej látky a schémy tvorby a rozkladu produktov transformácie (napr. 0, 1, 3, 7 dní; 2, 3 týždne; 1, 2, 3 mesiacov atď.).

Ak sa použije testovaná látka, označená ^{14}C, neextrahovateľná rádioaktivita sa kvantifikuje spaľovaním a vypočíta sa hmotnostná bilancia pre každý interval odberu.

V prípade anaeróbnej inkubácie a inkubácie v podmienkach ryžových polí sa pôdne a vodné fázy analyzujú spolu pre testovanú látku a produkty transformácie alebo sa pred extrakciou a analýzou oddelia pomocou filtrácie alebo centrifugácie.

1.9.4. **Nepovinné testy**

Aeróbne, nesterilné štúdie pri ďalších teplotách a vlhkostiach pôdy môžu byť užitočné na posúdenie vplyvu teploty a vlhkosti pôdy na mieru transformácie testovanej látky a/alebo jej produktov transformácie v pôde.

Ďalšiu charakterizáciu neextrahovateľnej rádioaktivity možno skúsiť napríklad superkritickou fluidnou extrakciou.

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Množstvá testovanej látky, produktov transformácie, prchavých látok (iba v percentách) a neextrahovateľných látok sa vyjadria v percentách aplikovanej počiatočnej koncentrácie a v prípade potreby ako mg/kg pôdy (vo vzťahu k suchej hmotnosti pôdy) pre každý interval odberu. Hmotnostná bilancia sa uvedie v percentách aplikovanej počiatočnej koncentrácie pre každý interval odberu. Grafické znázornenie koncentrácií testovanej látky v závislosti od času umožní stanovenie jej polčasu transformácie alebo DT_{50}. Mali by sa identifikovať hlavné produkty transformácie a ich koncentrácie by sa tiež mali vyniesť v závislosti od času na znázornenie ich miery tvorby a rozkladu. Hlavný produkt transformácie je každý produkt, ktorý predstavuje ≥ 10 % aplikovanej dávky kedykoľvek počas štúdie.

Zachytené prchavé látky poskytujú dôkazy o možnej prchavosti testovanej látky a jej produktov transformácie z pôdy.

▼B

Presnejšie stanovenia polčasov alebo hodnôt DT_{50}, prípadne hodnôt DT_{75} a DT_{90}, by sa mali získať s použitím výpočtov príslušného kinetického modelu. Polčas a hodnoty DT_{50} by sa mali zaznamenať spolu s opisom použitého modelu, kinetického rádu a determinačného koeficientu (r^2). Kinetika prvého rádu sa uprednostňuje, pokiaľ $r^2 < 0,7$. V prípade potreby by sa výpočty mali použiť aj na hlavné produkty transformácie. Príklady príslušných modelov sú uvedené v odkazoch (31) až (35).

Ak sa štúdie miery transformácie vykonávajú pri rôznych teplotách, miera transformácie sa uvedie ako funkcia teploty v rámci experimentálneho rozsahu teploty s použitím Arrheniovho vzťahu vo forme:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ alebo } \ln k = 1nA - \frac{B}{T},$$

kde ln A je regresná konštanta zo zadržania a ln B je regresná konštanta nábehu, prípadne najlepšieho smeru uvoľneného z lineárnej regresie ln k proti l/T, k je množstvová konštanta pri teplote T a T je teplota v kelvinoch. Je potrebné venovať pozornosť obmedzenému rozsahu teplôt, v ktorom platí Arrheniov vzťah v prípade, ak sa transformácia riadi mikrobiálnou aktivitou.

2.2. HODNOTENIE A INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Aj keď sa štúdie uskutočňujú v neprirodzenom laboratórnom systéme, výsledky umožnia posúdiť mieru transformácie testovanej látky a tiež mieru tvorby a rozkladu produktov transformácie v podmienkach v teréne (36) (37).

Štúdia cesty transformácie testovanej látky poskytuje informácie o spôsobe, akým sa aplikovaná látka v pôde štrukturálne mení chemickými a mikrobiálnymi reakciami.

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

SPRÁVA O TESTE

Správa o teste musí obsahovať:

Testovaná látka:

— všeobecný názov, chemický názov, číslo CAS, štruktúrny vzorec [uvádzajúci pozíciu označenia(-í), ak sa použije rádioaktívne označený materiál] a príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti (pozri oddiel 1.5),

— čistota (nečistoty) testovanej látky,

— rádiochemická čistota označenej chemikálie a špecifická aktivita (v prípade potreby).

Referenčné látky:

— chemický názov a štruktúra referenčných látok použitých na charakterizáciu a/alebo identifikáciu produktu transformácie.

Testované pôdy:

— údaje o mieste odberu,

— dátum a postup odberu vzoriek pôdy,

▼B

— vlastnosti pôd, ako napr. pH, obsah organického uhlíka, textúra (koľko percent piesku, koľko percent bahna, koľko percent ílu), katiónová výmenná kapacita, objemová hmotnosť, charakteristika retencie vody a mikrobiálna biomasa,

— dĺžka skladovania pôdy a podmienky skladovania (ak sa skladuje).

Testovacie podmienky:

— dátumy uskutočnenia štúdií,

— množstvo použitej testovanej látky,

— použité rozpúšťadlá a metóda aplikácie pre testovanú látku,

— hmotnosť ošetrenej pôdy na začiatku testu a v každom intervale odberu na analýzu,

— opis použitého inkubačného systému,

— miera prietoku vzduchu (iba pre prietokové systémy),

— teplota experimentálnej zostavy,

— obsah pôdnej vlhkosti počas inkubácie,

— mikrobiálna biomasa na začiatku, v priebehu a na konci aeróbnych štúdií,

— pH, koncentrácia kyslíka a redox potenciál na začiatku, v priebehu a na konci anaeróbnych a štúdií v podmienkach ryžových polí,

— extrakčná(-é) metóda(-y),

— metódy kvantifikácie a identifikácie testovanej látky a hlavné produkty transformácie v pôde a absorpčné materiály,

— počet paralelných vzoriek a počet kontrol.

Výsledky:

— výsledok stanovenia mikrobiálnej aktivity,

— opakovateľnosť a citlivosť použitých analytických metód,

— miera regenerácie percentuálne hodnoty pre platnú štúdiu sú uvedené v oddiele 1.7.1),

— tabuľky s výsledkami vyjadrenými v percentách aplikovanej počiatočnej dávky a v prípade potreby ako mg/kg pôdy (vzťahuje sa na suchú hmotnosť),

— hmotnostná bilancia v priebehu štúdií a na ich konci,

— charakterizácia neextrahovateľnej (viazanej) rádioaktivity alebo rezíduí v pôde,

— kvantifikácia uvoľneného CO_2 a iných prchavých látok,

— grafické znázornenie pôdnych koncentrácií proti času pre testovanú látku a v prípade potreby pre hlavné produkty transformácie,

— polčas alebo DT_{50}, DT_{75} a DT_{90} pre testovanú látku a v prípade potreby pre hlavné produkty transformácie, vrátane hraníc spoľahlivosti,

▼B

— posúdenie miery abiotickej degradácie v sterilných podmienkach,

— vyhodnotenie kinetiky transformácie pre testovanú látku a v prípade potreby pre hlavné produkty transformácie,

— v prípade potreby údaje o cestách transformácie,

— diskusia a interpretácia výsledkov,

— nespracované údaje (t. j. chromatogramy vzoriek, vzorové výpočty miery transformácie a prostriedky použité na identifikáciu produktov transformácie).

4. **ODKAZY**

(1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.

(2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.

(3) Európska únia (EÚ) (1995). Smernica Komisie 95/36/ES zo 14. júla 1995, ktorou sa mení a dopĺňa smernica Rady 91/414/-EHS o umiestnení prípravkov na ochranu rastlín na trh. Príloha II časť A a príloha III časť A: Osud a správanie sa účinnej látky v životnom prostredí.

(4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.

(5) BBA (1986). Richtlinie fur die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden – Abbau, Umwandlung und Metabolismus.

(6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality – Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil – Part 1: Aerobic conditions.

(7) ISO 14239 (1997). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions.

(8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.

(9) MAFF – Japan 2000 – Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil–Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).

(10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgirate, Italy, 18 – 20 January 1995.

(11) Guth, J. A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123 – 157.

(12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley – VCH (1998).

(13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945-956 (IUPAC 1984).

(14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

▼B

(15) ISO 10381-6 (1993). Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.

(16) Príloha V k smernici 67/548/EHS.

(17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85 – 114.

(18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962).

(19) Methods of Soil Analysis (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(20) Methods of Soil Analysis (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. Agronomy Series No 9, 2nd Edition.

(21) ISO Standard Compendium Environment (1994). Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition.

(22) Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

(23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). Lehrbuch der Bodenkunde. F. Enke Verlag, Stuttgart.

(24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil Biol. Biochem. 10, 215 – 221.

(25) ISO 14240-1 and 2 (1997). Soil Quality – Determination of soil microbial biomass –Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.

(26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In Pesticide Effects on Soil Microflora. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45 – 60.

(27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and biotransformation of pesticides in aqueous environment. Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide, 105 – 120.

(28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 59 – 63 (SETAC-Europe).

(29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjödahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality, 68 – 69 (SETAC-Europe).

(30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. Plant and Soil 102, 197 – 200.

(31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141 – 146.

▼B

(32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides, 181 – 199.

(33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In „Environmental Dynamics of Pesticides“. R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135 – 172.

(34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 39, 188 – 204.

(35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer 33, 47 – 60.

(36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. Environm. Sci. Technol. 24, 1032 – 1041.

(37) Hurle K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83 – 122.

▼B

DODATOK 1

TLAK VODY, KAPACITA POĽA (KP) A KAPACITA ZADRŽIAVANIA VODY (KZV) [1]

Výška vodného stĺpca [cm]	pF [a]	bar [b]	Poznámky
10^7	7	10^4	suchá pôda
$1{,}6 \times 10^4$	4,2	16	bod vädnutia
10^4	4	10	
10^3	3	1	
6×10^2	2,8	0,6	
$3{,}3 \times 10^2$	2,5	0,33 [c]	rozsah kapacity poľa [d]
10^2	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	KVZ (aproximácia)
1	0	0,001	vodou nasýtená pôda

[a] pF = logaritmus cm vodného stĺpca.
[b] 1 bar = 10^5 Pa.
[c] Zodpovedá približnému obsahu vody 10 % v piesku, 35 % v hline a 45 % v íle.
[d] Kapacita poľa nie je konštantná, ale mení sa s typom pôdy medzi pF 1,5 a 2,5.

Tlak vody sa meria v cm vodného stĺpca alebo v baroch. Kvôli veľkému rozsahu sacieho tlaku sa vyjadruje jednoducho ako hodnota pF, ktorá je zodpovedá logaritmu cm vodného stĺpca.

Kapacita poľa sa definuje ako množstvo vody, ktoré sa môže v prírodnej pôde zachovať proti gravitácii 2 dni po dlhšom období dažďov alebo po dostatočnom zavlažovaní. Stanovuje sa v nenarušenej pôde *in situ* v teréne. Meranie sa teda nepoužíva na narušené laboratórne vzorky pôdy. Stanovené hodnoty KP v narušených pôdach môžu vykazovať veľké systematické odchýlky.

Kapacita zadržiavania vody (KZV) sa stanovuje v laboratóriu s nenarušenou a narušenou pôdou nasýtením stĺpca pôdy vodou prostredníctvom kapilárnej vzlínavosti. Je to osobitne dôležité pre narušené pôdy a môže byť až o 30 % väčšia ako kapacita poľa (1). Je tiež jednoduchšie experimentálne stanoviť spoľahlivé hodnoty KP.

Poznámky

[1] Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

DODATOK 2

OBSAH PÔDNEJ VLHKOSTI (g vody na 100 g suchej pôdy) RÔZNYCH TYPOV PÔDY Z RÔZNYCH KRAJÍN

Typ pôdy	Krajina	Pôdna vlhkosť pri		
		KZV (1)	pF = 1,8	pF = 2,5
Piesok	Nemecko	28,7	8,8	3,9
Hlinitý piesok	Nemecko	50,4	17,9	12,1
Hlinitý piesok	Švajčiarsko	44,0	35,3	9,2
Prachovitá hlina	Švajčiarsko	72,8	56,6	28,4
Ílovitá hlina	Brazília	69,7	38,4	27,3
Ílovitá hlina	Japonsko	74,4	57,8	31,4
Piesčitá hlina	Japonsko	82,4	59,2	36,0
Prachovitá hlina	USA	47,2	33,2	18,8
Piesčitá hlina	USA	40,4	25,2	13,3

(1) Kapacita zadržiavania vody.

▼B

DODATOK 3

Obrázok 1

Príklad prietokového prístroja na štúdium transformácie chemikálií v pôde ([1]) ([2])

1: ihlový ventil

2: plynová premývacia fľaša obsahujúca vodu

3: ultramembráma (iba sterilné podmienky), veľkosť pórov 0,2 µm

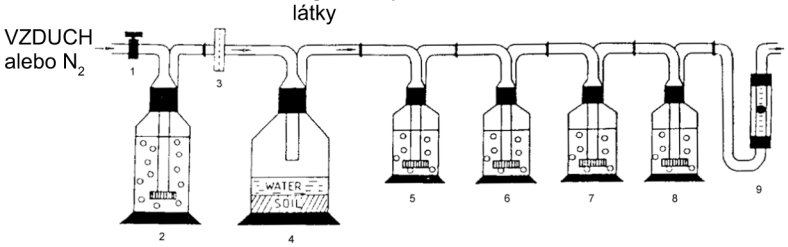
4: banka pôdneho metabolizmu (zaliata vodou iba v prípade anaeróbnych podmienok a podmienok ryžových polí)

5: lapač etylén-glykolom na organické prchavé látky

6: lapač kyselinou sírovou na alkalické prchavé látky

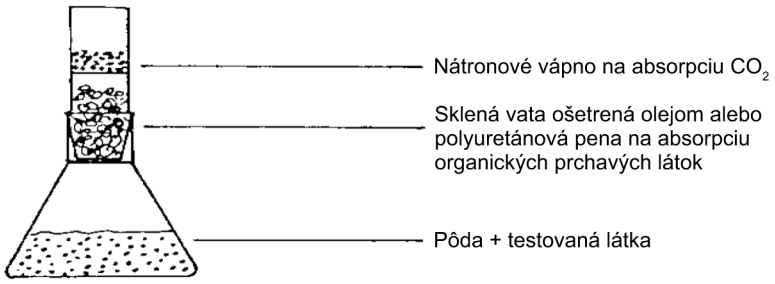
7, 8: lapač hydroxidom sodným na CO_2 a iné kyslé prchavé látky

9: prietokomer



Obrázok 2

Príklad banky biometrického typu na štúdium transformácie chemikálií v pôde ([3])



([1]) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123 – 157.

([2]) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85 – 114.

([3]) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141 – 146.

▼B

C.24. AERÓBNA A ANAERÓBNA TRANSFORMÁCIA V SYSTÉMOCH VODA/SEDIMENT

1. METÓDA

Táto testovacia metóda zodpovedá OECD TG 308 (2002).

1.1. ÚVOD

Chemikálie sa môžu dostať do plytkých alebo hlbokých povrchových vôd takými cestami, ako je priama aplikácia, postrek, odtok, odvodnenie, zneškodňovanie odpadov, priemyselné, domáce alebo poľnohospodárske odpadové vody a atmosférické usadzovanie. Táto testovacia metóda opisuje laboratórnu metódu na hodnotenie aeróbnej a anaeróbnej transformácie organických chemikálií v systémoch voda/sediment. Táto testovacia metóda je založená na existujúcich usmerneniach (1) (2) (3) (4) (5) (6). Na OECD workshope o výbere pôd/sedimentov, ktorý sa konal v talianskom Belgirate v roku 1995 (7) sa konkrétne dohodlo množstvo a typ sedimentov používaných v tomto teste. Tiež sa vydali odporúčania týkajúce sa odberu, manipulácie a skladovania vzoriek sedimentov, ktoré sa zakladajú na pokynoch ISO (8). Takéto štúdie sa vyžadujú pre chemikálie, ktoré sa priamo aplikujú to vody alebo ktoré sa môžu dostať do vodného prostredia vyššie uvedenými cestami.

Podmienky v prírodných systémoch voda/sediment sú často aeróbne vo vrchnej vodnej fáze. Povrchová vrstva sedimentu môže byť buď aeróbna, alebo anaeróbna, zatiaľ čo hlbšie vrstvy sedimentu sú zvyčajne anaeróbne. Aby sa zahrnuli obe tieto možnosti, v tomto dokumente sa opisujú aeróbne aj aneróbne testy. Aeróbny test simuluje aeróbny vodný stĺpec nad aeróbnou vrstvou sedimentu, ktorá je podvrstvená anaeróbnym gradientom. Anaeróbny test simuluje úplný anaeróbny systém voda-sediment. Ak z okolností vyplýva, že je potrebné značne sa odkloniť od týchto odporúčaní, napríklad použiť intaktné jadrá sedimentov alebo sedimenty, ktoré môžu byť vystavené pôsobeniu testovanej látky, sú na tento účel dostupné iné metódy (9).

1.2. DEFINÍCIE

V každom prípade sa použijú medzinárodné jednotky (SI).

Testovaná látka: každá látka, či východisková, alebo príslušné produkty transformácie.

Produkty transformácie: všetky látky, ktoré vzniknú z biotických a abiotických transformačných reakcií testovanej látky, vrátane CO_2 a viazaných rezíduí.

Viazané rezíduá:„Viazané rezíduá“ sú zlúčeniny v pôde, rastlinách alebo zvieratách, ktoré pretrvávajú po extrakcii v matrici vo forme východzej zlúčeniny alebo jej metabolitu(-ov). Extrakčná metóda nemusí podstatne meniť samotné zlúčeniny alebo štruktúru matrice. Charakter väzby sa čiastočne dá objasniť extrakčnými metódami, ktorými sa mení matrica, a zložitými analytickými technikami. Doposiaľ sa identifikovali týmto spôsobom napríklad kovalentné iónové a sorpčné väzby, ako aj zadržiavanie. Vo všeobecnosti vznik viazaných rezíduí významne znižuje biologickú prístupnosť a biologickú dostupnosť (10) [upravené z IUPAC 1984 (11)].

▼B

Aeróbna transformácia: (oxidačná): reakcie, ktoré sa vyskytujú v prítomnosti molekulárneho kyslíka (12).

Anaeróbna transformácia: (redukčná): reakcie, ktoré sa vyskytujú za neprítomnosti molekulárneho kyslíka (12).

Prírodné vody: sú povrchové vody získané z nádrží, riek, potokov atď.

Sediment: je zmes minerálnych a organických chemických zložiek, pričom organické chemické zložky obsahujú zlúčeniny s vysokým obsahom uhlíka a dusíka a s vysokými molekulovými hmotnosťami. Ukladá sa prírodnou vodou a tvorí rozhranie s vodou.

Mineralizácia: je kompletná degradácia organickej zlúčeniny na CO_2, H_2O v aeróbnych podmienkach a na CH_4, CO_2 a H_2O v anaeróbnych podmienkach. V súvislosti s touto testovacou metódou, ak sa používa rádioaktívne označená zlúčenina, mineralizácia znamená rozsiahlu degradáciu molekuly, počas ktorej sa označený atóm uhlíka kvantitatívne oxiduje alebo redukuje za uvoľnenia príslušného množstva $^{14}CO_2$ alebo $^{14}CH_4$.

Polčas, $t_{0,5}$, je čas, za ktorý sa transformuje 50 % testovanej látky, ak sa transformácia dá opísať kinetikou prvého rádu; je nezávislý od koncentrácie.

DT_{50} (Doba odbúrania 50): je čas, za ktorý sa koncentrácia testovanej látky zníži o 50 %.

DT_{75} (Doba odbúrania 75): je čas, za ktorý sa koncentrácia testovanej látky zníži o 75 %.

DT_{90} (Doba odbúrania 90): je čas, za ktorý sa koncentrácia testovanej látky zníži o 90 %.

1.3. REFERENČNÉ LÁTKY

Referenčné látky by sa mali používať na identifikáciu a kvantifikáciu produktov transformácie spektroskopickými a chromatografickými metódami.

1.4. INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

Na meranie miery transformácie sa môže použiť neoznačená alebo izotopom označená testovaná látka, aj keď sa uprednostňuje označený materiál. Označený materiál sa vyžaduje pri skúmaní ciest transformácie a pri stanovení hmotnostnej bilancie. Odporúča sa označenie pomocou ^{14}C, ale môže použiť aj označenie inými izotopmi, ako napr. ^{13}C, ^{15}N, ^{3}H, ^{32}P. Značka sa umiestni pokiaľ možno v najstabilnejšej(-ích) časti(-iach) molekuly ([1]). Chemická a/-alebo rádiochemická čistota testovanej látky by mala byť aspoň 95 %.

Pred uskutočnením testuje potrebné, aby boli k dispozícii tieto informácie:

a) rozpustnosť vo vode (metóda A. 6);

b) rozpustnosť v organických rozpúšťadlách;

c) tlak pár (metóda A.4) a Henryho konštanta;

([1]) Napríklad, ak látka obsahuje jeden kruh, označenie tohto kruhu je potrebné; ak testovaná látka obsahuje dva alebo viac kruhov, samostatné štúdie môžu byť potrebné na hodnotenie osudu každého označeného kruhu a na získanie príslušných informácií o tvorbe produktov transformácie.

▼B

d) rozdeľovací koeficient n-oktanol/voda (metóda A. 8);

e) adsorpčný koeficient (K_d, K_f alebo K_{oc}, podľa potreby) (metóda C. 18);

f) hydrolýza (metóda C.7);

g) disociačná konštanta (pK_a) [usmernenie OECD 112] (13);

h) chemická štruktúra testovanej látky a pozícia izotopového označenia, v prípade potreby.

Poznámka: Zaznamená sa teplota, pri ktorej sa robili tieto merania.

Iné užitočné informácie môžu obsahovať údaje o toxicite testovanej látky pre mikroorganizmy, údaje o rýchlej a/alebo potenciálnej biologickej rozložiteľnosti a údaje o aeróbnej a anaeróbnej transformácii v pôde.

Je potrebné mať k dispozícii analytické metódy (vrátane extrakčných a purifikačných metód) na identifikáciu a kvantifikáciu testovanej látky a jej produktov transformácie vo vode a v sedimente (pozri oddiel 1.7.2).

1.5. PRINCÍP TESTOVACEJ METÓDY

Metóda uvedená v tomto teste využíva systém aeróbnych a anaeróbnych vodných sedimentov (pozri dodatok 1), ktorý umožňuje:

— meranie miery transformácie testovanej látky v systéme voda-sediment,

— meranie miery transformácie testovanej látky v sedimente,

— meranie miery mineralizácie testovanej látky a/alebo jej produktov transformácie (ak sa použije testovaná látka označená ^{14}C),

— identifikáciu a kvantifikáciu produktov transformácie vo vodnej fáze a fáze sedimentu vrátane hmotnostnej bilancie (ak sa použije označená testovaná látka),

— meranie distribúcie testovanej látky a jej produktov transformácie medzi dvoma fázami počas inkubačnej doby v tme (aby sa zabránilo, napríklad, rozmnoženiu rias) pri stálej teplote. Polčasy, hodnoty DT_{50}, DT_{75} a DT_{90} sa stanovia, ak to umožňujú údaje, ale nesmú sa extrapolovať veľmi dlho od doby experimentu (pozri oddiel 1.2).

Aspoň dva sedimenty a ich pridružené vody sú potrebné pre aeróbne a anaeróbne štúdie (7). Môžu sa však vyskytnúť prípady, keď je potrebné použiť viac ako dva vodné sedimenty, napríklad v prípade chemikálie, ktorá sa môže nachádzať v sladkých a/alebo morských vodách.

▼B

1.6. POUŽITEĽNOSŤ TESTU

Metóda je všeobecne použiteľná na všetky chemické látky (neoznačené alebo označené), pre ktoré je k dispozícii analytická metóda s dostatočnou presnosťou a citlivosťou. Je použiteľná na mierne prchavé, neprchavé, vo vode rozpustné alebo vo vode zle rozpustné zlúčeniny. Test sa nepoužíva na chemikálie, ktoré sú veľmi prchavé z vody (napr. fumiganty, organické rozpúšťadlá), a teda sa pri experimentálnych podmienkach testu nemôžu uchovať vo vode.

Metóda sa doteraz používala na skúmanie transformácie chemikálií v sladkých vodách a sedimentoch, ale v zásade sa dá použiť aj na systémy ústí riek a morské systémy. Nie je vhodná na simulovanie podmienok v tečúcich vodách (napr. rieky) alebo podmienok otvoreného mora.

1.7. KRITÉRIÁ KVALITY

1.7.1. **Regenerácia**

Extrakcia a analýza minimálne dvoch paralelných vzoriek vody a sedimentu ihneď po pridaní testovanej látky poskytuje prvý dôkaz reprodukovateľnosti analytickej metódy a rovnomerného rozdelenia testovanej látky pri aplikácii. Regenerácie v neskorších stupňoch experimentov sú dané príslušnými hmotnostnými bilanciami (ak sa použije označený materiál). Regenerácie by mali byť v rozsahu od 90 % do 110 % pre označené chemikálie (6) a od 70 % do 110 % pre neoznačené chemikálie.

1.7.2. **Reprodukovateľnosť a citlivosť analytickej metódy**

Repredukovateľnosť analytickej metódy (okrem počiatočnej účinnosti extrakcie) na kvantifikovanie testovanej látky a produktov transformácie sa môže overiť paralelnou analýzou rovnakého extraktu vzoriek vody alebo sedimentu, ktorý sa inkuboval dostatočne dlho, aby vznikli produkty transformácie.

Detekčný limit (LOD) analytickej metódy pre testovanú látku a pre produkty transformácie má byť aspoň 0,01 mg/kg vo vode alebo sedimente (ako testovaná látka) alebo 1 % počiatočnej dávky, aplikovanej do testovaného systému, podľa toho ktorá hodnota je nižšia. Je potrebné stanoviť aj kvantifikačný limit (LOQ).

1.7.3. **Presnosť údajov o transformácii**

Regresná analýza koncentrácií testovanej látky v závislosti od času poskytuje príslušné informácie o presnosti transformačnej krivky a umožní výpočet hraníc spoľahlivosti pre polčasy (ak platí kinetika pseudo prvého rádu) alebo hodnôt DT_{50} a v prípade potreby DT_{75} a DT_{90}.

1.8. OPIS METÓDY

1.8.1. **Testovaný systém a aparatúra**

Štúdia by sa mala vykonať v sklenených nádobách (t. j. fľaše, centrifugačné kyvety), pokiaľ z predbežných informácií (napr. rozdeľovací koeficient n-oktanol-voda, sorpčné údaje atď.) nevyplýva, že testovaná látka môže priľnúť na sklo, v takomto prípade sa môže uvažovať o použití alternatívneho materiálu, napr. teflónu). Ak je známe, že testovaná látka priľne na sklo, môže sa tento problém vyriešiť pomocou jednej alebo viacerých z týchto metód:

▼B

— stanoviť hmotnosť testovanej látky a produktov transformácie zachytenej na sklo,

— zabezpečiť, aby sa umyli rozpúšťadlom všetky sklenené pomôcky na konci testu,

— použiť zložené výrobky (pozri tiež oddiel 1.9.2),

— použiť väčšie množstvo pomocných rozpúšťadiel na pridávanie testovanej látky do systému; ak sa pomocné rozpúšťadlá používajú, musí to byť pomocné rozpúšťadlo, ktoré nespôsobí solvolýzu testovanej látky.

Príklady typickej pokusnej aparatúry, t. j. plynový prietokový systém a systém biometrického typu, sú znázornené v dodatku 2 a 3 (14). Ďalšie užitočné inkubačné systémy sú uvedené v odkaze (15). Konštrukcia pokusnej aparatúry by mala umožniť výmenu vzduchu alebo dusíka a zachytenie prchavých produktov. Rozmery aparatúry musia byť také, aby boli v súlade s požiadavkami testu (pozri oddiel 1.9.1). Prevzdušnenie sa zabezpečí buď jemným prebublávaním, alebo prepúšťaním vzduchu alebo dusíka nad povrchom vody. V druhom prípade pre lepšiu distribúciu kyslíka alebo dusíka vo vode sa môže odporúčať jemné miešanie vody zvrchu. Vzduch zbavený CO_2 by sa nemal používať, lebo môže spôsobiť zvýšenie pH vody. V každom prípade narušenie sedimentu nie je želateľné a, pokiaľ možno, treba mu zabrániť. Mierne prchavé látky by sa mali testovať v systéme biometrického typu jemným premiešaním povrchu vody. Môžu sa použiť aj uzavreté nádoby s plynnou fázou tvorenou atmosférickým vzduchom alebo dusíkom a internými nádobkami na zachytávanie prchavých produktov (16). Je potrebná pravidelná výmena plynnej fázy v aeróbnom teste, aby sa kompenzovala spotreba kyslíka biomasou.

Vhodné zachytávače na zachytávanie prchavých produktov transformácie obsahujú okrem iného roztoky hydroxidu draselného alebo hydroxidu sodného v koncentrácii 1 mol/dm^3 pre oxid uhličitý ([1]) a etylénglykol, etanolamín alebo 2 % parafín v xyléne pre organické zlúčeniny. Prchavé látky, ktoré sa tvoria za anaeróbnych podmienok, ako napr. metán, sa môžu zachytávať, napríklad molekulovými sitami. Takéto prchavé látky sa môžu spaľovať, napríklad na CO_2 prepúšťaním plynu cez kremennú trubicu naplnenú CuO pri teplote 900 °C a zachytávaním vzniknutého CO_2 v absorbéri s alkalickou látkou (17).

Je potrebné laboratórne zariadenie na chemickú analýzu testovanej látky a produktov transformácie [(t. j. plynová kvapalinová chromatografia (GLC), vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC), chromatografia na tenkej vrstve (TLC), hmotnostná spektroskopia (MS), plynová chromatografia – hmotnostná spektroskopia (GC-MS), kvapalinová chromatografia – hmotnostná spektrometria (LC-MS), jadrová magnetická rezonancia (NMR) atď.], vrátane detekčných systémov pre rádioaktívne označené a neoznačené chemikálie, podľa potreby. Ak sa používa rádioaktívne označený materiál, bude potrebný aj kvapalný scintilačný počítač a oxidačné činidlo na spaľovanie (na spaľovanie vzoriek sedimentu na analýzu rádioaktivity).

V prípade potreby je potrebné ďalšie bežné laboratórne zariadenie na fyzikálno-chemické a biologické stanovenia (pozri tabuľku v oddiele 1.8.2.2), sklenené nádoby, chemikálie a reagencie.

([1]) Keďže tieto alkalické absorpčné roztoky tiež absorbujú oxid uhličitý zo vzduchu pri prevzdušňovaní, ktorý sa tvorí respiráciou pri aeróbnych pokusoch, musia sa v pravidelných intervaloch vymieňať, aby sa zabránilo ich saturácii, a tým strate ich absorpčnej kapacity.

▼B

1.8.2. **Výber a počet vodných sedimentov**

Miesta odberu sa zvolia v súlade s cieľom testu v danej situácii. Pri výbere miest odberu sa musia posúdiť predchádzajúce možné vstupy z poľnohospodárstva, priemyslu alebo domácností do spádovej oblasti a horných tokov. Sedimenty sa nepoužijú, ak boli kontaminované testovanou látkou alebo jej štrukturálnymi analógmi počas predchádzajúcich 4 rokov.

1.8.2.1. *Výber sedimentu*

Na aeróbne štúdie sa zvyčajne používajú dva sedimenty (7). Vybraté dva sedimenty by sa mali odlišovať v obsahu organického uhlíka a textúrou. Jeden sediment by mal mať vysoký obsah organického uhlíka (2,5 % – 7,5 %) a jemnú textúru, druhý sediment by mal mať nízky obsah organického uhlíka (0,5 % – 2,5 %) a hrubú textúru. Rozdiel medzi obsahom organického uhlíka by mal byť zvyčajne aspoň 2 %. „Jemná textúra“ je definovaná ako obsah [íl + bahno] ([1]) > 50 % a „hrubá textúra“ je definovaná ako obsah [íl + bahno] < 50 %. Rozdiel v obsahu [íl + bahno] pre dva sedimenty by mal byť zvyčajne aspoň 20 %. V prípadoch keď sa chemikália môže dostať aj do morských vôd, aspoň jeden z týchto systémov voda-sediment by mal pochádzať z mora.

Pre striktne anaeróbnu štúdiu sa dva sedimenty (vrátane ich pridružených vôd) odoberú z anaeróbnych zón povrchových vodných telies (7). S obidvoma fázami sediment aj voda sa manipuluje opatrne a prepravujú sa takisto opatrne bez prítomnosti kyslíka.

Ďalšie parametre môžu byť dôležité pri výbere sedimentov a je ich potrebné posudzovať podľa jednotlivých prípadov. Napríklad rozsah pH sedimentov by mohol byť dôležitý pri testovaní chemikálií, v prípade ktorých transformácia a/alebo sorpcia môže závisieť od pH. Závislosť sorpcie od pH môže vyjadrovať pK_a testovanej látky.

1.8.2.2. *Charakterizácia vzoriek voda-sediment*

Kľúčové parametre, ktoré sa musia merať a uviesť v správe (s odkazom na použitú metódu) pre vodu aj sediment, a štádium testu, v ktorom sa tieto parametre majú stanoviť, sú zosumarizované v ďalej uvedenej tabuľke. Informácie o metódach na stanovenie týchto parametrov sú uvedené odkazoch (18) (19) (20) (21).

Podľa okolností je potrebné stanoviť a uviesť v správe aj ďalšie parametre [napr. pre sladkú vodu: častice, zásaditosť, tvrdosť, konduktivitu, NO_3/PO_4 (pomer a jednotlivé hodnoty); pre sedimenty: katiónovú výmennú kapacitu, kapacitu zadržiavania vody, uhličitany, celkový dusík a fosfor; a pre morské systémy: soľnatosť]. Analýza sedimentov a vody na nitrát, sulfát, biologicky dostupné železo a prípadne iné akceptory elektrónov môže byť tiež užitočná pri posudzovaní redoxných podmienok najmä vo vzťahu k anaeróbnej transformácii.

([1]) [íl + bahno] je minerálna frakcia sedimentu s veľkosťou častíc < 50 μm.

▼B

Stanovenie parametrov na charakterizáciu vzoriek voda-sediment (7) (22) (23)

Parameter	Štádium postupu testu					
	odber vzoriek v teréne	manipulácia	začiatok aklimatizácie	začiatok testu	priebeh testu	koniec testu
Voda						
Pôvod/zdroj	x					
Teplota	x					
pH	x		x	x	x	x
TOC (celková koncentrácia organického kyslíka)			x	x		x
koncentrácia O_2 (*)	x		x	x	x	x
Redox potenciál (**)			x	x	x	x
Sediment						
Pôvod/zdroj	x					
Hĺbka vrstvy	x					
pH		x	x	x	x	x
Distribúcia veľkosti častíc		x				
TOC (celková koncentrácia organického kyslíka)		x	x	x		x
Mikrobiálna biomasa (*)		x		x		x
Redox potenciál (**)	pozorovanie (farba/vôňa)		x	x	x	x

(*) Z posledných výsledkov výskumu vyplýva, že merania koncentrácií kyslíka vo vode a redox potenciálov nemá mechanistickú ani prognostickú hodnotu, pokiaľ ide o rast a vývoj mikrobiálnych populácií v povrchových vodách (24) (25). Stanovenie biochemickej spotreby kyslíka (BSK, pri odbere vzoriek v teréne, na začiatku a konci testu) a koncentrácií mikro/makro živín Ca, Mg a Mn (na začiatku a konci testu) vo vode a meranie celkového N a celkového P v sedimentoch (pri odbere vzoriek v teréne a na konci testu) môžu byť lepšími nástrojmi na vyjadrenie a posúdenie miery a ciest aeróbnej biotransformácie.

(**) Metóda rýchlosti mikrobiálnej respirácie (26), fumigačná metóda (27) alebo stanovenie počtu mikroorganizmov (napr. baktérie, aktinomycéty, plesne a celkové kolónie) pre aeróbne štúdie; miera metanogenézy pre anaeróbne štúdie.

1.8.3. **Odber, manipulácia a skladovanie**

1.8.3.1. *Odber*

Odber vzoriek sedimentu by sa mal robiť podľa návrhu pokynov ISO pre odber vzoriek spodného sedimentu (8). Vzorky sedimentu by sa mali odobrať z celkovej vrchnej vrstvy 5 cm až 10 cm sedimentu. Pridružené vody by sa mali odobrať z rovnakého miesta alebo lokality a v rovnaký čas ako sediment. Pre anaeróbnu štúdiu by sa mali odobrať vzorky sedimentu a pridruženej vody a dopraviť za neprítomnosti kyslíka (28) (pozri oddiel 1.8.2.1). Niektoré zariadenia na odber vzoriek sú uvedené v odkazoch (8) (23).

▼B

1.8.3.2. *Manipulácia*

Sediment sa oddelí od vody filtráciou a tento sediment sa za mokra preoseje na site s otvormi 2 mm s použitím nadbytku vody z lokality a voda z lokality sa potom odstráni. Potom sa známe množstvá sedimentov a vody zmiešajú v požadovanom pomere (pozri oddiel 1.9.1) v inkubačných bankách a pripravia na aklimatizačné obdobie (pozri oddiel 1.8.4). V prípade anaeróbnej štúdie sa všetky kroky pri manipulácii musia uskutočňovať za neprítomnosti kyslíka (29) (30) (31) (32) (33).

1.8.3.3. *Uchovávanie*

Dôrazne sa odporúča použiť čerstvo odobraté vzorky sedimentu a vody, ale ak je potrebné skladovanie, sediment a voda sa preoseje, ako je uvedené vyššie, a skladujú sa spolu zaliate vodou (6 cm – 10 cm vodná vrstva), v tme, pri 4 °C ± 2 °C([4]) maximálne 4 týždne (7) (8) (23). Vzorky na použitie v aeróbnych štúdiách sa skladujú za voľného prístupu vzduchu (napr. v otvorených nádobách), zatiaľ čo vzorky na použitie v anaeróbnych štúdiách za neprítomnosti kyslíka. Počas prepravy a skladovania nesmie sediment ani voda zamrznúť a sediment tiež nesmie vyschnúť.

1.8.4. **Príprava vzoriek sedimentu/vody na test**

Pred pridaním testovanej látky by sa mala uskutočniť aklimatizácia každej vzorky sedimentu/vody, ktorá sa umiestni do inkubačnej nádoby, ktorá sa má použiť v základnom teste, a aklimatizácia sa uskutoční za presne rovnakých podmienok ako inkubácia v teste (pozri oddiel 1.9.1). Doba aklimatizácie je čas potrebný na dosiahnutie primeranej stability systému vyjadrenej hodnotou pH, koncentráciou kyslíka vo vode, redox potenciálom sedimentu a vody a makroskopickou separáciou fáz. Doba aklimatizácie by mala zvyčajne trvať medzi jedným a dvoma týždňami a nemala by presiahnuť štyri týždne. Výsledky stanovení uskutočnených počas tohto obdobia by sa mali zaznamenať.

1.9. VYKONANIE TESTU

1.9.1. **Testovacie podmienky**

Test by sa mal uskutočniť v inkubačnom zariadení (pozri oddiel 1.8.1) s pomerom objemu voda/sediment medzi 3:1 a 4:1 a vrstvou sedimentu 2,5 cm (± 0,5 cm) ([1]). Odporúča sa minimálne množstvo 50 g sedimentu (suchá hmotnosť) na inkubačnú nádobu.

Test by sa mal uskutočniť v tme pri stálej teplote v rozmedzí 10 °C až 30 °C. Teplota (20 °C ± 2 °C) je primeraná. V prípade potreby sa môže v jednotlivých prípadoch dodatočne uvažovať o nižšej teplote (napr. 10 °C) v závislosti od informácií, ktoré sa na základe testu požadujú. Inkubačnú teplotu je potrebné sledovať a zaznamenávať.

([1]) Posledné štúdie ukázali, že skladovanie pri 4 °C môže viesť k poklesu obsahu organického uhlíka sedimentu, ktorý môže mať prípadne za následok zníženie mikrobiálnej aktivity (34).

▼B

1.9.2. **Spracovanie a aplikácia testovanej látky**

Používa sa jedna testovacia koncentrácia chemikálie ([1]). Pre chemikálie na ochranu rastlín, ktoré sa priamo aplikujú do vodných telies, maximálna dávka uvedená na označení je maximálna aplikačná dávka, ktorá sa vypočíta vo vzťahu na povrch vody v testovacej nádobe. Vo všetkých ostatných prípadoch by koncentrácia, ktorá sa má použiť, mala vychádzať z výpočtov environmentálnych emisií. Je potrebné venovať pozornosť na zabezpečenie toho, aby sa na charakterizáciu cesty transformácie a tvorby a rozkladu produktov transformácie použila primeraná koncentrácia testovanej látky. Môže byť potrebné použiť vyššie dávky (napr. 10-násobné) v situáciách, keď sa koncentrácie testovanej látky približujú k detekčným limitom na začiatku štúdie a/alebo sa hlavné produkty transformácie nedajú jasne stanoviť, keď ich podiel tvorí 10 % aplikačnej dávky testovanej látky. Ak sa však použijú vyššie testovacie koncentrácie, nemali by mať významný nepriaznivý účinok na mikrobiálnu aktivitu systému voda-sediment. Aby sa dosiahla konštantná koncentrácia testovanej látky v nádobách rôznych rozmerov, môže byť potrebné zvážiť prispôsobenie na množstvo použitého materiálu na základe hĺbky vodného stĺpca v nádobe vo vzťahu k hĺbke vody v teréne (predpokladá sa, že bude 100 cm, ale môžu sa použiť iné hĺbky). Príklady výpočtu pozri v dodatku 4.

V ideálnom prípade by sa mala testovaná látka aplikovať ako vodný roztok do vodnej fázy testovaného systému. Ak je to nevyhnuté, povoľuje sa použiť nízke množstvá vodou zmiešateľných rozpúšťadiel (ako napr. acetón, etanol) na aplikáciu a distribúciu testovanej látky, ale nemali by presiahnuť 1 obj. % a nemali by mať nepriaznivé účinky na mikrobiálnu aktivitu testovaného systému. Pri príprave vodného roztoku testovanej látky je potrebné dávať pozor – na zabezpečenie úplnej homogenity môže byť potrebné použiť stĺpcové usporiadanie generátora a premiešanie. Po pridaní vodného roztoku do testovaného systému sa odporúča jemné premiešanie vodnej fázy tak, aby sa čo najmenej narušil sediment.

Použitie zložených prípravkov sa bežne neodporúča, pretože zložky prípravku môžu ovplyvniť distribúciu testovanej látky a/alebo produktov transformácie medzi vodnou fázou a fázou sedimentu. Použitie zloženého materiálu však môže byť vhodnou alternatívou, napríklad v prípade vo vode ťažko rozpustných testovaných látok.

Počet inkubačných nádob závisí od počtu odberov (pozri oddiel 1.9.3). Je potrebné použiť dostatočný počet testovaných systémov tak, aby sa na každý odber mohli použiť dva systémy. Ak sa používajú kontrolné jednotky každého systému voda/sediment, nemali by sa ošetrovať testovanou látkou. Kontrolné jednotky sa môžu použiť na stanovenie mikrobiálnej biomasy sedimentu a celkového organického uhlíka vody a sedimentu na konci štúdie. Dve kontrolné jednotky (t. j. jedna kontrolná jednotka každého vodného sedimentu) sa môže použiť na sledovanie požadovaných parametrov v sedimente a vode počas doby aklimatizácie (pozri tabuľku v oddiele 1.8.2.2). Dve ďalšie kontrolné jednotky sa musia použiť v prípade, keď sa testovaná látka aplikuje s použitím rozpúšťadla na stanovenie nepriaznivých účinkov na mikrobiálnu aktivitu testovaného systému.

([1]) Test s druhou koncentráciou môže byť užitočný pre chemikálie, ktoré sa dostanú do povrchových vôd rôznymi cestami vstupu, výsledkom čoho sú značne rozdielne koncentrácie, pokiaľ sa nižšia koncentrácia dá analyzovať s dostatočnou presnosťou.

▼B

1.9.3. **Trvanie testu a odber vzoriek**

Trvanie experimentu by zvyčajne nemalo byť dlhšie ako 100 dní (6) a malo by pokračovať až do stanovenia cesty degradácie a modelu distribúcie voda/sediment, alebo kým sa transformáciou rozloží a/alebo vyprchá 90 % testovanej látky. Malo by sa vykonať aspoň šesť odberov (vrátane času nula) s nepovinnou predbežnou štúdiou (pozri oddiel 1.9.4), ktorá sa použije na stanovenie vhodného režimu odberov vzoriek a trvania testu, pokiaľ nebudú k dispozícii dostačujúce údaje o testovanej látke z predchádzajúcich štúdií. Pre hydrofóbne testované látky môžu byť potrebné ďalšie odbery v priebehu počiatočného štádia štúdie, aby sa stanovila miera distribúcie medzi vodnou fázou a fázou sedimentu.

V dobe príslušných odberov sa všetky inkubačné nádoby (paralelne) odoberú na analýzu. Sediment a voda nad ním sa analyzujú samostatne ([1]). Povrchová voda by sa mala opatrne odstrániť tak, aby sa čo najmenej narušil sediment. Extrakcia a charakterizácia testovanej látky a produkty transformácie by sa mali uskutočniť podľa príslušných analytických postupov. Je potrebné venovať pozornosť, aby sa odstránil materiál, ktorý sa môže naadsorbovať na inkubačnú nádobu alebo na rúrky, ktoré slúžia na prepojenie pri zachytávaní prchavých látok.

1.9.4. **Nepovinný predbežný test**

Ak sa trvanie a režim odberov vzoriek nedá určiť z iných príslušných štúdií o testovanej látke, môže sa usúdiť, že je vhodné vykonať nepovinný predbežný test, ktorý by sa uskutočnil za rovnakých testovacích podmienok, aké sú navrhnuté pre konečnú štúdiu. Príslušné experimentálne podmienky a výsledky z predbežného testu, ak sa uskutoční, by sa mali stručne zaznamenávať.

1.9.5. **Merania a analýza**

Koncentrácia testovanej látky a produktov transformácie pri každom odbere vo vode a sedimente by sa mala stanoviť a zaznamenať (ako koncentrácia a ako percentuálny podiel použitého množstva). Vo všeobecnosti by sa mali identifikovať produkty transformácie stanovené pri ≥ 10 % použitej rádioaktivity v celom systéme voda-sediment pri ktoromkoľvek odbere, pokiaľ neexistuje iný riadne odôvodnený postup. Produkty transformácie, pre ktoré sa koncentrácie trvale zvyšujú počas štúdie, by sa taktiež mali posúdiť na identifikáciu, aj keď ich koncentrácie nepresahujú limity uvedené vyššie, lebo to môže byť dôkazom perzistencie. Toto je potrebné posúdiť na základe jednotlivých prípadov s odôvodneniami, ktoré sa uvedú v správe.

Výsledky zo systémov na zachytávanie plynov/prchavých látok (CO_2 a iné, t. j. prchavé organické látky) by sa mali zaznamenať pri každom odbere. Mala by sa zaznamenať miera mineralizácie. Neextrahovateľné (viazané) rezíduá v sedimente sa zaznamenajú pri každom odbere.

([1]) V prípadoch, keď môže ľahko dôjsť k rýchlej reoxidácii anaeróbnych produktov transformácie, treba zachovať anaeróbne podmienky počas odberu vzoriek a analýzy.

▼B

2. **ÚDAJE**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Celková hmotnostná bilancia alebo regenerácia (pozri oddiel 1.7.1) pridanej rádioaktivity sa vypočíta pri každom odbere. Výsledky sa zaznamenajú ako percentuálna hodnota pridanej rádioaktivity. Distribúcia rádioaktivity medzi vodou a sedimentom sa zaznamenáva ako koncentrácie a percentuálne hodnoty pri každom odbere.

Polčas, DT_{50} a v prípade potreby DT_{75} a DT_{90} testovanej látky sa vypočítajú spolu s ich hranicami spoľahlivosti (pozri oddiel 1.7.3). Informácie o miere rozptylu testovanej látky vo vode a sedimente sa získajú na základe použitia príslušných vyhodnocovacích nástrojov. K nim môže patriť použitie kinetiky pseudo prvého rádu, empirické techniky (konštrukcia krivky bod po bode), ktoré používajú grafické alebo numerické riešenia a komplexnejšie vyhodnotenia s použitím napríklad jednoduchých alebo niekoľkonásobných kazetových modelov. Ďalšie informácie je možné získať z odkazov (35) (36) (37).

Všetky prístupy majú svoje silné a slabé stránky a odlišujú sa v komplexnosti. Predpoklad kinetiky prvého rádu môže byť prílišným zjednodušením procesov degradácie a distribúcie, ale ak je možné, poskytuje hodnotu (rýchlostnú konštantu alebo polčas), ktorá je ľahko zrozumiteľná a má zmysel pre simulačné modelovanie a výpočty očakávaných environmentálnych koncentrácií. Výsledkom empirických prístupov alebo lineárnych transformácií môže byť lepšie prispôsobenie kriviek údajom, a preto umožňujú lepšie stanovenie polčasov, hodnôt DT_{50} a v prípade potreby DT_{75} a DT_{90}. Použitie odvodených konštánt je však obmedzené. Kazetové modely môžu vytvoriť množstvo užitočných konštánt, ktoré majú význam pri hodnotení rizika, ktoré opisuje mieru degradácie v rôznych kazetách a distribúciu chemikálie. Používajú sa na stanovenie rýchlostných konštánt na tvorbu a degradáciu hlavných produktov transformácie. V každom prípade sa zvolená metóda musí zdôvodniť a experimentátor demonštrovať graficky a/alebo štatisticky správnosť prispôsobenia.

3. **PODÁVANIE SPRÁV**

3.1. SPRÁVA O TESTE

Správa musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

— všeobecný názov, chemický názov, číslo CAS, štruktúrny vzorec [uvádzajúci pozíciu označenia(-í), ak sa použije rádioaktívne označený materiál] a príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— čistota (nečistoty) testovanej látky,

— rádiochemická čistota označenej chemikálie a molárna aktivita (v prípade potreby).

▼B

Referenčné látky:

— chemický názov a štruktúra referenčných látok použitých na charakterizáciu a/alebo identifikáciu produktov transformácie.

Testované sedimenty a vody:

— umiestnenie a opis miesta (miest) odberu vzoriek vodného sedimentu vrátane, ak je to možné, predchádzajúcej kontaminácie,

— všetky informácie týkajúce sa odberu, skladovania (ak sa uskutočnilo) a aklimatizácie systémov voda-sediment,

— charakteristiky vzoriek voda-sediment, ako sú uvedené v tabuľke v oddiele 1.8.2.2.

Testovacie podmienky:

— použitý systém testovania (napr. prietokový, biometrický, spôsob ventilácie, metóda miešania, objem vody, hmotnosť sedimentu, výška vodnej vrstvy a vrstvy sedimentu, rozmer testovacích nádob atď.),

— aplikácia testovanej látky na testovaný systém: použitá testovaná koncentrácia, počet paralelných a kontrolných vzoriek, spôsob aplikácie testovanej látky (napr. prípadného použitia rozpúšťadla) atď.,

— inkubačná teplota,

— počet odberov,

— extrakčné metódy a účinnosti, ako aj analytické metódy a detekčné limity,

— metódy na charakterizáciu/identifikáciu produktov transformácie,

— odchýlky od protokolu testu alebo testovacích podmienok počas štúdie.

Výsledky:

— číselné hodnoty nespracovaných údajov reprezentatívnych analýz (všetky nespracované údaje sa musia uchovávať v SLP archíve),

— opakovateľnosť a citlivosť použitých analytických metód,

— miera regenerácie (percentuálne hodnoty pre platnú štúdiu sú uvedené v oddiele 1.7.1),

— tabuľky s výsledkami vyjadrené ako % aplikovanej dávky a v mg/kg vo vode, sedimente a celkovom systéme (iba %) pre testovanú látku a v prípade potreby pre produkty transformácie a neextrahovateľnú rádioaktivitu,

— hmotnostná bilancia v priebehu a na konci štúdií,

— grafické znázornenie transformácie vo vodných frakciách a frakciách sedimentu a v celkovom systéme (vrátane mineralizácie),

— miera mineralizácie,

▼B

— polčas, hodnoty DT_{50} a v prípade potreby DT_{75} a DT_{90} pre testovanú látku a v prípade potreby pre hlavné produkty transformácie vrátane hraníc spoľahlivosti vo vode, sedimente a celkovom systéme,

— vyhodnotenie kinetiky transformácie testovanej látky a v prípade potreby hlavných produktov transformácie,

— údaje o cestách transformácie, v prípade potreby,

— diskusia k výsledkom.

4. **ODKAZY**

(1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5-1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.

(2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.

(3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United-Kingdom.

(4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) – Anaerobic and aerobic. Canada. pp 35 – 37.

(5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162-3, Anaerobic aquatic metabolism.

(6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.

(7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgirate, Italy, 18 – 20 January 1995.

(8) ISO/DIS 5667-12. (1994). Water quality – Sampling – Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.

(9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.

(10) DFG Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).

(11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945 – 956 (IUPAC 1984).

(12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).

(13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994 – 2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.

(14) Scholz, K, Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC – Pests and Diseases, 3B-4, 149 – 158.

▼B

(15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85 – 114. J. Wiley & Sons.

(16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, 631 – 637.

(17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with 14C-labelled model surfactants. Water Research 21, 661 – 667.

(18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.

(19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17th edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.

(20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.

(21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, 1038 – 1039.

(22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop „A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests“, 3 – 4 July 1991.

(23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8 – 10. November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.

(24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, 2858 – 2868.

(25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol, 329 – 338.

(26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively- metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. Soil Biol. Biochem. 17, 197 – 203.

(27) ISO-14240-2. (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation extraction method.

(28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), 13 – 21.

(29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, 850 – 857.

(30) Birch, R.R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527 – 1550.

(31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemoshpere 27, 1499 – 1509.

▼B

(32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of 14C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, 3597 – 3603.

(33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

(34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. Bulletin Environ. Contam. Toxicol. 58, 961 – 968.

(35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer, 39, 187 – 203.

(36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer, 33, 47 – 60.

(37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference – Pest and Diseases, 1349 – 1354.

▼B

DODATOK 1

USMERNENIE K AERÓBNYM A ANAERÓBNYM TESTOVANÝM SYSTÉMOM

Aeróbny testovaný systém

Aeróbny testovaný systém opísaný v tejto testovacej metóde pozostáva z aeróbnej vodnej vrstvy (zvyčajné koncentrácie kyslíka v rozsahu od 7 mg/l do 10 mg/l) a vrstvy sedimentu, aeróbnej na povrchu a anaeróbnej pod povrchom [zvyčajné priemerné redox potenciály (E_h) v anaeróbnej zóne sedimentu v rozsahu od – 80 do – 190 mV]. Nad povrchom vody v každej inkubačnej jednotke sa preženie zvlhčený vzduch, aby sa vo vrchnej časti zabezpečil dostatok kyslíka.

Anaeróbny testovaný systém

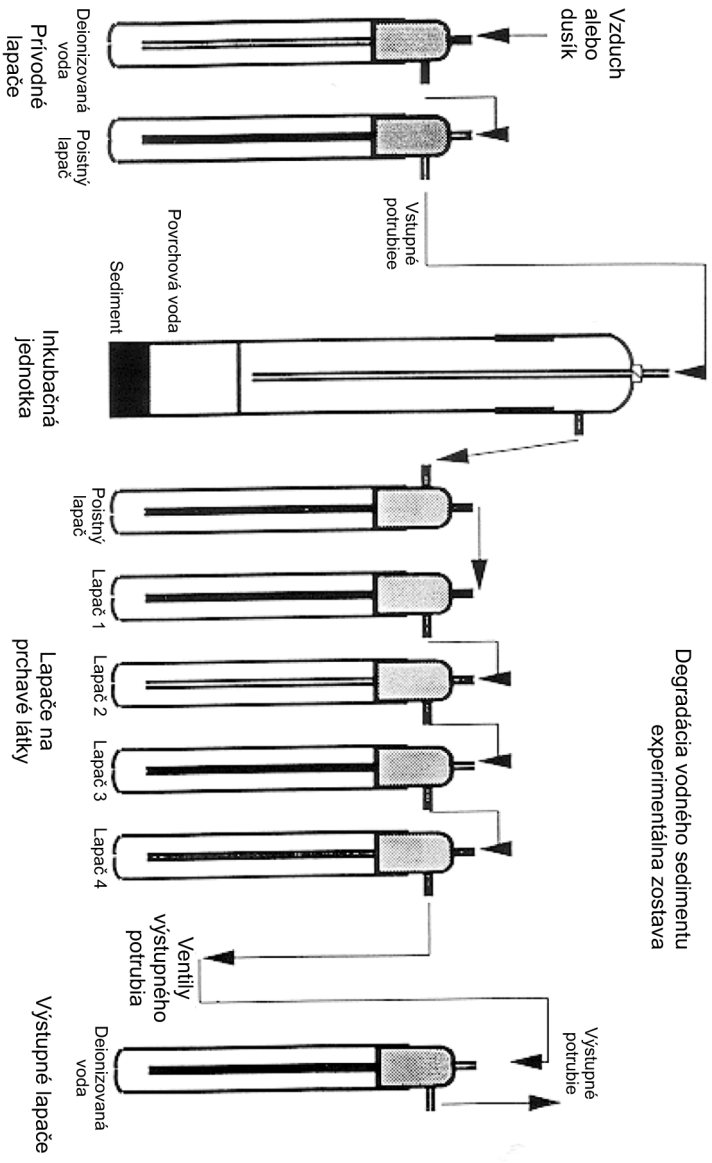
Pre anaeróbny testovaný systém je postup testu v podstate rovnaký, ako je uvedené pre aeróbny systém, s tou výnimkou, že zvlhčený dusík sa preženie nad povrchom vody v každej inkubačnej jednotke, aby sa vo vrchnej časti zachoval dostatok dusíka. Sediment a voda sa pokladajú za anaeróbne, keď je redox potenciál (E_h) nižší ako – 100 mV.

V anaeróbnom teste vyhodnotenie mineralizácie zahrnuje meranie uvoľneného oxidu uhličitého a metánu.

▼B

DODATOK 2

PRÍKLAD PLYNOVÉHO PRIETOKOVÉHO PRÍSTROJA

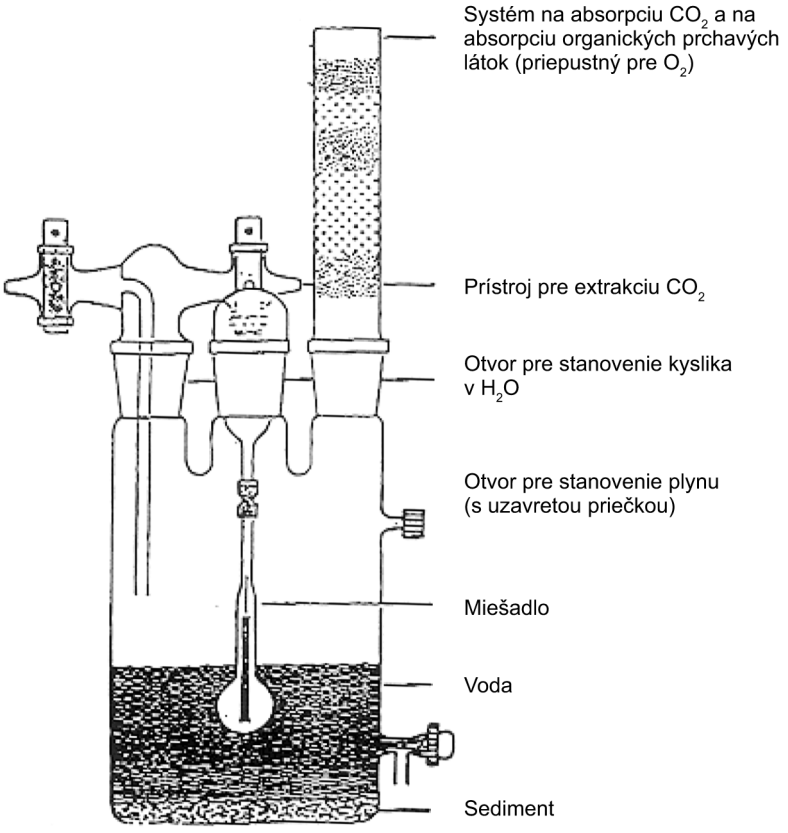


Bezpečnostný lapač, prázdny
Lapač 1:
etylénglykol na zachytenie organických látok
Lapač 2:
kyselina sírová 0,1 M na zachytenie alkalických prchavých látok
Lapač 3 a 4:
hydroxid sodný 2 M na zachytenie CO_2 a iných kyslých prchavých látok

▼B

DODATOK 3

PRÍKLAD BIOMETRICKÉHO PRÍSTROJA



▼B

DODATOK 4

PRÍKLAD VÝPOČTU PRE APLIKAČNÚ DÁVKU V TESTOVACÍCH NÁDOBÁCH

Vnútorný priemer valca:	= 8 cm
Výška vodného stĺpca bez sedimentu:	= 12 cm
Povrch: $3,142 \times 4^2$	= 50,3 cm^2
Aplikačná dávka: 500 g testovanej látky/ha zodpovedá 5 µg/cm^2	
Celkove µg: $5 \times 50,3$	= 251,5 µg
Vzťah množstva k výške vodného stĺpca 100 cm:	= 30,18 µg
$12 \times 251,5 \div 100$	
Objem vodného stĺpca: $50,3 \times 12$	= 603 ml
Koncentrácia vo vode: $30,18 \div 603$	= 0,050 µg/ml alebo 50 µg/l

▼M1

C.25. AERÓBNA MINERALIZÁCIA V POVRCHOVEJ VODE – SIMULAČNÝ TEST BIODEGRADÁCIE

1. METÓDA

Táto metóda je rovnocenná s OECD TG 309 (2004) (1).

1.1. ÚVOD

Cieľom tohto testu je stanoviť časový priebeh biodegradácie testovanej látky pri nízkej koncentrácii v aeróbnej prírodnej vode a kvantifikovať zistenia formou vyjadrenia kinetických rýchlostí. Tento simulačný test je laboratórny dávkový test trepačkovej banky na stanovenie rýchlostí aeróbnej biodegradácie organických látok vo vzorkách prírodnej povrchovej vody (sladkej, poloslanej alebo morskej). Je založený na ISO/DIS 14592 – 1 (2) a obsahuje aj prvky z testovacích metód C.23 a C.24 (3) (4). Voliteľne sa môže v prípade dlhodobých testov nahradiť dávkový postup semikontinuálnym postupom, aby sa zabránilo degenerácii testovaného mikrokozmu. Základným cieľom simulačného testu je stanoviť mineralizáciu testovanej látky v povrchovej vode a mineralizácia tvorí základ vyjadrenia kinetiky degradácie. Voliteľný druhý cieľ testu však slúži na získanie informácií o primárnej degradácii a vzniku hlavných transformačných produktov. Identifikácia transformačných produktov a prípadne kvantifikácia ich koncentrácií sú osobitne dôležité v prípade veľmi pomaly mineralizujúcich látok (napr. s polčasmi pre celkový zvyškový ^{14}C presahujúcimi 60 dní). Na identifikáciu a kvantifikáciu hlavných produktov transformácie sa musia kvôli analytickým obmedzeniam obvykle používať vyššie koncentrácie testovanej látky (napr. > 100 µg/l).

Nízka koncentrácia v tomto teste znamená koncentráciu (napr. menej ako 1 µg/l až 100 µg/l), ktorá je dostatočne nízka na zabezpečenie toho, aby kinetika biodegradácie získaná z testu odrážala koncentrácie predpokladané v prostredí. V porovnaní s celkovým množstvom biologicky odbúrateľných uhlíkových substrátov dostupných v prírodnej vode použitej v teste bude testovaná látka prítomná v nízkej koncentrácii slúžiť ako sekundárny substrát. Z toho vyplýva, že predpokladaná kinetika biodegradácie je prvého poriadku („nerastová“ kinetika) a že testovaná látka sa môže dať odbúrať „kometabolizmom“. Z kinetiky prvého poriadku vyplýva, že rýchlosť degradácie (mg/L/day) je úmerná koncentrácii látky, ktorá sa časom znižuje. V prípade pravej kinetiky prvého poriadku špecifická degradačná rýchlostná konštanta k nie je závislá od času a koncentrácie. Znamená to, že k významne nemení svoju hodnotu počas pokusu a pridávanou koncentráciou medzi pokusmi sa nemení. Podľa definície sa špecifická degradačná rýchlostná konštanta rovná relatívnej zmene koncentrácie za čas: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Aj keď sa obvykle predpokladá kinetika prvého poriadku za predpísaných podmienok, za určitých okolností môžu byť vhodnejšie iné kinetiky. Odchýlky od kinetiky prvého poriadku sa môžu pozorovať napríklad vtedy, ak jav prenosu hmoty, ako napr. rýchlosť difúzie, obmedzuje skôr rýchlosť biotransformácie ako rýchlosť biologickej reakcie. Údaje sa dajú takmer vždy opísať kinetikou pseudoprvého poriadku pri akceptácii závislosti rýchlostnej konštanty od koncentrácie.

▼M1

Informácie o biologickej odbúrateľnosti testovanej látky pri vyšších koncentráciách (napr. zo štandardných skríningových testov), ako aj informácie o abiotickej odbúrateľnosti, produktoch transformácie a príslušných fyzikálnochemických vlastnostiach musia byť pred testom k dispozícii ako pomôcka pri plánovaní pokusu a interpretácii výsledkov. Použitie testovaných látok označených ^{14}C a stanovenie fázového rozdelenia ^{14}C na konci testu umožní stanoviť konečnú biologickú odbúrateľnosť. Ak sa použije neoznačená testovaná látka, možno odhadnúť iba konečnú biodegradáciu, ak sa testuje vyššia koncentrácia a všetky známe produkty transformácie sú známe.

1.2. VYMEDZENIE POJMOV

Primárna biodegradácia: Štrukturálna zmena (transformácia) chemickej látky mikroorganizmami, ktorá má za následok stratu chemickej identity.

Funkčná biodegradácia: Štrukturálna zmena (transformácia) chemickej látky mikroorganizmami, ktorá má za následok stratu špecifickej vlastnosti.

Konečná aeróbna biodegradácia: Rozloženie chemickej látky mikroorganizmami v prítomnosti kyslíka na oxid uhličitý, vodu a minerálne soli všetkých ostatných prítomných prvkov (mineralizácia) a vznik novej biomasy a organických mikrobiálnych produktov biosyntézy.

Mineralizácia: Rozloženie chemickej látky alebo organického materiálu mikroorganizmami v prítomnosti kyslíka na oxid uhličitý, vodu a minerálne soli všetkých ostatných prítomných prvkov.

Lag fáza: Dosiahnutý čas od začiatku testu do prispôsobenia degradujúcich mikroorganizmov a do zvýšenia stupňa biodegradácie chemickej látky alebo organického materiálu na úroveň stanoviteľnosti (napr. 10 % maximálnej teoretickej biodegradácie alebo menej v závislosti od presnosti meracej techniky).

Maximálna úroveň biodegradácie: Stupeň biodegradácie chemickej látky alebo organickej hmoty v teste zaznamenaný v percentách, po ktorom sa už žiadna ďalšia biodegradácia neuskutoční.

Primárny substrát: Súbor prírodných zdrojov uhlíka a energie, ktoré zabezpečujú rast a udržiavanie mikrobiálnej biomasy.

Sekundárny substrát: Zložka substrátu prítomná v takej nízkej koncentrácii, že jej degradáciou by sa príslušným mikroorganizmom dodali iba nepatrné množstvá uhlíka a energie v porovnaní s uhlíkom a energiou dodanými degradáciou hlavných zložiek substrátu (primárne substráty).

Degradačná rýchlostná konštanta: Rýchlostná konštanta prvého poriadku alebo pseudoprvého poriadku k (d^{-1}), ktorá vyjadruje rýchlosť procesov degradácie. Pre dávkový pokus sa k odhadne zo začiatočnej časti degradačnej krivky získanej po ukončení lag fázy.

▼M1

Polčas, $t_{1/2}$ (d): Termín používaný na charakterizáciu rýchlosti reakcie prvého poriadku. Je to časový interval, ktorý zodpovedá poklesu koncentrácie o faktor 2. Polčas a degradačná rýchlostná konštanta sú vo vzťahu vyjadrenom rovnicou $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Polčas degradácie, DT_{50} (d): Termín používaný na kvantifikáciu výsledku biodegradačných testov. Je to časový interval vrátane lag fázy, potrebný na dosiahnutie hodnoty 50 % biodegradácie.

Detekčný limit (LOD) a kvantifikačný limit (LOQ): Detekčný limit (LOD) je koncentrácia látky, pod ktorou nemožno odlíšiť identitu látky od analytických údajov. Kvantifikačný limit (LOQ) je koncentrácia látky, pod ktorou nemožno stanoviť koncentráciu s prípustnou presnosťou.

Rozpustený organický uhlík (DOC): Tá časť organického uhlíka vo vzorke vody, ktorá sa nedá odstrániť špecifickým oddelením fáz, napríklad centrifugáciou 15 minút pri 40 000 ms^{-2} alebo membránovou filtráciou s použitím membrán s pórmi s priemerom 0,2 μm –0,45 μm.

Celková aktivita organického ^{14}C (TOA): Celková aktivita ^{14}C spojená s organickým uhlíkom.

Aktivita rozpusteného organického ^{14}C (DOA): Celková aktivita ^{14}C spojená s rozpustených organickým uhlíkom.

Aktivita časticového organického ^{14}C (POA): Celková aktivita ^{14}C spojená s organickým uhlíkom v časticiach.

1.3. POUŽITEĽNOSŤ TESTU

Tento simulačný test sa dá použiť na neprchavé alebo mierne prchavé organické látky testované pri nízkych koncentráciách. Pri použití baniek, ktoré umožňujú prístup vzduchu (napr. s vatovými zátkami), sa môžu látky s Henryho konštantami menšími ako približne 1 $Pa \cdot m^3/mol$ (pribl. 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) v podstate pokladať za neprchavé. Pri použití uzavretých baniek s plynnou fázou možno testovať mierne prchavé látky (s Henryho konštantami < 100 $Pa \cdot m^3/mol$ alebo < 10^{-3} $atm \cdot m^3/mol$) bez strát z testovacieho systému. Ak sa pri odstraňovaní CO_2 nevykonajú príslušné opatrenia, môže sa vyskytnúť strata látok označených ^{14}C. Za takýchto okolností môže byť potrebné, aby sa CO_2 zachytil v internom absorbéri s alkalickým hydroxidom alebo aby sa použil externý absorpčný systém na CO_2 (priame stanovenie $^{14}CO_2$, pozri dodatok 3). Na stanovenie kinetiky biodegradácie musia byť koncentrácie testovanej látky nižšie ako jej rozpustnosť vo vode. Je však potrebné pripomenúť, že hodnoty rozpustnosti vo vode z literatúry môžu byť značne vyššie ako rozpustnosť testovanej látky v prírodných vodách. Prípadne sa môže rozpustnosť testovacích látok, ktoré sú mimoriadne zle rozpustné vo vode, stanoviť tak, že sa použijú testované prírodné vody.

Môže sa použiť metóda na simuláciu biodegradácie v povrchovej vode bez hrubých častíc („pelagický test“) alebo v kalnej povrchovej vode, ktorá sa môže vyskytovať napr. v blízkosti rozhrania voda/-sediment („test suspendovaného sedimentu“).

▼M1

1.4. PRINCÍP TESTU

Test sa uskutočňuje v dávkach tak, že sa inkubuje testovaná látka buď iba s povrchovou vodou („pelagický test“), alebo s povrchovou vodou doplnenou o suspendované tuhé látky/sediment 0,01 až 1 g/L sušiny („test suspendovaného sedimentu“) na simuláciu vodného toku so suspendovanými tuhými látkami alebo resuspendovaným sedimentom. Koncentrácia suspendovaných tuhých látok/sedimentu v spodnom rozsahu tohto intervalu je typická pre väčšinu povrchových vôd. Testovacie banky sa inkubujú v tme pri teplote prostredia za aeróbnych podmienok a miešania. Na účely stanovenia kinetiky degradácie sa musia použiť minimálne dve rozdielne koncentrácie testovanej látky. Koncentrácie sa musia navzájom odlišovať o faktor 5 až 10 a mali by predstavovať predpokladaný rozsah koncentrácií v prostredí. Maximálna koncentrácia testovanej látky nesmie byť vyššia ako 100 µg/L, ale uprednostňujú sa maximálne testované koncentrácie nižšie ako 10 µg/L alebo menej, aby sa zabezpečilo, že biodegradácia prebieha podľa kinetiky prvého poriadku. Najnižšia koncentrácia nesmie byť vyššia ako 10 µg/L, ale uprednostňujú sa najnižšie testované koncentrácie 1 – 2 µg/L alebo menej ako 1 µg/L. S použitím obchodne dostupných látok označených ^{14}C možno uskutočniť náležitú analýzu takejto nízkej koncentrácie. Pre analytické obmedzenia často nemožno stanoviť koncentráciu testovanej látky s potrebnou presnosťou, ak sa použije testovaná látka pri koncentrácii ≤ 100 µg/L (pozri druhý odsek v oddiele 1.7.2). Môžu sa použiť vyššie koncentrácie testovanej látky (> 100 µg/L a niekedy > 1 mg/L) na identifikáciu a kvantifikáciu hlavných produktov transformácie alebo vtedy, ak nie je dostupná špecifická analytická metóda s nízkym detekčným limitom. Ak sa testujú vysoké koncentrácie testovanej látky, môže sa stať, že sa nebudú dať použiť výsledky na stanovenie degradačnej konštanty prvého poriadku a polčas, keďže degradácia pravdepodobne nebude prebiehať podľa kinetiky prvého poriadku.

Ak sa použije špecifická chemická analýza, sleduje sa degradácia v príslušných časových intervaloch a meria sa buď zvyškový ^{14}C, alebo zvyšková koncentrácia testovanej látky. Označenie najstabilnejšej časti molekuly ^{14}C zabezpečuje stanovenie celkovej mineralizácie, zatiaľ čo označenie ^{14}C najmenej stabilnej časti molekuly, ako aj použitie špecifickej analýzy umožňuje iba vyhodnotenie primárnej biodegradácie. Najstabilnejšia časť však nemusí zahŕňať relevantnú funkčnú časť molekuly (ktorá môže súvisieť so špecifickou vlastnosťou, ako napr. toxicita, bioakumulácia atď.). V tomto prípade môže byť potrebné otestovať látku označenú ^{14}C vo funkčnej časti na sledovanie eliminácie špecifickej vlastnosti.

1.5. INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

V tomto teste sa môžu použiť radioaktívne označené aj neoznačené testované látky. Odporúča sa technika označenia ^{14}C a označenie musí byť spravidla na najstabilnejšej časti(-iach) molekuly (pozri aj oddiel 1.4). Pre látky obsahujúce viac ako jeden aromatický kruh sa prednostne označí ^{14}C jeden alebo viac uhlíkov v každom kruhu. Okrem toho sa označí ^{14}C jeden alebo viac uhlíkov na oboch stranách ľahko degradovateľných väzieb. Chemická a/alebo rádiochemická čistota testovanej látky musí byť > 95 %. V prípade rádioaktívne označených látok sa uprednostňuje špecifická aktivita v hodnote približne 50 µCi/mg (1,85 MBq) alebo viac, aby sa umožnili merania ^{14}C v testoch s nízkymi začiatočnými koncentráciami. Musia byť dostupné tieto informácie o testovanej látke:

▼**M1**

— rozpustnosť vo vode [metóda A.6],

— rozpustnosť v organickom(-ých) rozpúšťadle(-ách) (látky použité s rozpúšťadlom alebo s nízkou rozpustnosťou vo vode),

— disociačná konštanta (pKa), ak je látka náchylná na protonizáciu alebo deprotonizáciu [OECD TG 112] (5),

— tlak pár [metóda A.4] a Henryho konštanta,

— chemická stabilita vo vode a v tme (hydrolýza) [metóda C.7].

Ak sa testujú vo vode málo rozpustné látky v morskej vode, môže byť takisto osožné poznať vysoľovací koeficient (alebo „Sečenovovov koeficient“) K^s, ktorý je definovaný výrazom: log (S/S') = K^s C_m, kde S je rozpustnosť látky v čerstvej vode a S' je rozpustnosť látky v morskej vode a C_m je molárna koncentrácia soli.

Ak sa test vykonáva ako „test suspendovaného sedimentu“, musia byť k dispozícii aj tieto informácie:

— rozdeľovací koeficient n-oktanol/voda [metóda A.8],

— adsorpčný koeficient [metóda C.18].

Ostatné osožné informácie môžu zahŕňať:

— environmentálnu koncentráciu, ak je známa alebo odhadnutá,

— toxicitu testovanej látky pre mikroorganizmy [metóda C.11],

— ľahkú a/alebo prirodzenú biodegradovateľnosť [metódy C.4 A – F, C.12, C.9, OECD TG 302 (5)],

— aeróbnu alebo anaeróbnu biodegradovateľnosť v štúdiách transformácie v pôde a systémoch sediment/voda [metódy C.23, C.24].

1.6. REFERENČNÁ LÁTKA

Ako referenčnú látku je potrebné použiť látku, ktorá sa za aeróbnych podmienok bežne ľahko odbúrava (napr. anilín alebo benzoát sodný). Predpokladaný časový interval pre degradáciu anilínu a benzoátu sodného je obvykle menej ako 2 týždne. Účelom referenčných látok je zabezpečiť, aby mikrobiálna aktivita testovanej vody bola v určitých hraniciach, t. j. aby voda obsahovala aktívnu mikrobiálnu populáciu.

▼M1

1.7. KRITÉRIÁ KVALITY

1.7.1. **Výťažnosť**

Hneď po pridaní testovanej látky sa musí každá počiatočná koncentrácia preveriť stanovením aktivity ^{14}C alebo chemickou analýzou v prípade neoznačených látok minimálne s jednou paralelnou vzorkou. Poskytnú sa tým informácie o použiteľnosti a opakovateľnosti analytickej metódy a o homogenite rozdelenia testovanej látky. Obvykle sa v následnej analýze údajov skôr používa nameraná počiatočná aktivita ^{14}C alebo koncentrácia testovanej látky ako nominálna koncentrácia, keďže sa tým kompenzujú straty kvôli adsorpcii a chybám pri dávkovaní. Pre testovanú látku ^{14}C je úroveň výťažnosti na konci pokusu daná hmotnostnou bilanciou (pozri posledný odsek v oddiele 1.8.9.4). V ideálnom prípade by mala byť radioaktívne označená hmotnostná bilancia v rozsahu od 90 % do 110 %, zatiaľ čo analytická presnosť v prípade neoznačených testovaných látok by mala viesť k počiatočnej výťažnosti medzi 70 % a 110 %. Tieto rozsahy je potrebné interpretovať ako ciele a nemali by sa používať ako kritériá pre prípustnosť testu. Voliteľne sa pre testovanú látku a pre hlavné produkty transformácie môže analytická presnosť stanoviť pri nižšej koncentrácii ako počiatočná koncentrácia.

1.7.2. **Opakovateľnosť a citlivosť analytickej metódy**

Opakovateľnosť analytickej metódy (vrátane účinnosti počiatočnej extrakcie) na kvantifikáciu testovanej látky a produktov transformácie sa v prípade potreby musí preveriť piatimi paralelnými analýzami jednotlivých extraktov povrchovej vody.

Detekčný limit (LOD) analytickej metódy pre testovanú látku a pre produkty transformácie musí byť aspoň 1 % z počiatočného množstva aplikovaného na testovací systém, ak je to možné. Limit kvantifikácie (LOQ) musí byť rovný alebo menší ako 10 % použitej koncentrácie. Chemická analýza mnohých organických látok a ich produktov transformácie často vyžaduje, aby sa testovaná látka použila v pomerne vysokej koncentrácii, t. j. > 100 μg/L.

1.8. OPIS TESTOVACEJ METÓDY

1.8.1. **Zariadenie**

Test sa môže vykonávať v Erlenmeyerových alebo valcovitých bankách vhodnej kapacity (napr. 0,5 alebo 1,0 litra) uzatvorených silikónovými alebo gumovými zátkami, alebo v sérových bankách s uzávermi neprepúšťajúcimi CO_2 (napr. s butylkaučukovou zátkou). Ďalšia možnosť je vykonať test s použitím viacerých baniek a zužitkovať celé banky aspoň v dvoch paralelkách v každom časovom intervale (pozri posledný odsek v oddiele 1.8.9.1). Pre neprchavé testované látky, ktoré nie sú rádioaktívne označené, nie sú potrebné plynotesné zátky ani uzávery, vhodné sú voľné vatové zátky, ktoré zabraňujú kontaminácii z ovzdušia (pozri druhý odsek v oddiele 1.8.9.1). Mierne prchavé látky sa musia testovať v systéme biometrického typu jemným premiešavaním vodného povrchu. Na zabránenie bakteriálnej kontaminácii sa nádoby môžu prípadne pred použitím sterilizovať zahriatím alebo autoklávovaním. Okrem toho sa môže použiť toto štandardné laboratórne zariadenie:

— trepačka alebo magnetické miešadlá na nepretržité miešanie testovacích baniek,

▼M1

— centrifúga,

— pH meter,

— turbidimeter na nefelometrické merania zákalu,

— pec alebo mikrovlnná pec na stanovenia sušiny,

— prístroj na membránovú filtráciu,

— autokláv alebo pec na tepelnú sterilizáciu sklených nádob,

— zariadenia na manipuláciu s látkami označenými ^{14}C,

— zariadenie na kvantifikáciu aktivity ^{14}C vo vzorkách z roztokov na zachytávanie CO_2 a v prípade potreby zo vzoriek sedimentu,

— analytické zariadenie na stanovenie testovanej (a referenčnej) látky, ak sa používa špecifická chemická analýza (napr. plynová chromatografia, vysokotlaková kvapalinová chromatografia).

1.8.2. **Zásobné roztoky testovanej látky**

Na prípravu zásobných roztokov testovaných a referenčných látok sa používa deionizovaná voda (pozri prvý odsek v oddiele 1.8.7). Deionizovaná voda musí byť zbavená látok, ktoré môžu byť toxické pre mikroorganizmy, a rozpustený organický uhlík (DOC) nesmie tvoriť viac ako 1 mg/L (6).

1.8.3. **Odber a preprava povrchovej vody**

Miesto odberu povrchovej vody sa zvolí v súlade s cieľom testu v danej situácii. Pri výbere miest odberu sa musia posúdiť predchádzajúce možné vstupy z poľnohospodárstva, priemyslu alebo domácností. Ak je známe, že vodné prostredie bolo kontaminované testovanou látkou alebo jej štrukturálnymi analógmi v priebehu predchádzajúcich štyroch rokov, nesmie sa použiť na odber testovanej vody, pokiaľ preskúmanie rýchlostí degradácie v miestach, ktoré už boli vystavené pôsobeniu, nie je výslovným cieľom výskumného pracovníka. V mieste odberu sa zmeria pH a teplota vody. Ďalej je potrebné zaznamenať hĺbku odberu vzorky a vzhľad vzorky vody (napr. farbu a zakalenie) (pozri oddiel 3). Stanoví sa koncentrácia kyslíka a/alebo redoxný potenciál vo vode a v povrchovej vrstve sedimentu na dôkaz aeróbnych podmienok, pokiaľ to nie je zrejmé z posúdenia vzhľadu a predchádzajúcich skúseností s týmto miestom. Povrchová voda sa prepravuje v dôkladne vyčistenej nádobe. Počas prepravy nesmie teplota vzorky výrazne prekročiť teplotu používanú v teste. Odporúča sa chladenie pri 4 °C, ak preprava trvá viac ako 2 až 3 hodiny. Vzorka vody nesmie byť zamrznutá.

▼M1

1.8.4. **Skladovanie a príprava povrchovej vody**

Test je potrebné prednostne začať do nasledujúceho dňa po odbere vzorky. Skladovanie vody je v prípade potreby nevyhnutné minimalizovať a nesmie v žiadnom prípade prekročiť maximálne 4 týždne. Vzorka vody sa do použitia udržiava pri 4 °C za prístupu vzduchu. Pred použitím sa odstránia hrubé častice, napr. filtráciou cez nylonový filter približne s 100 μm veľkosťou ôk alebo cez hrubý papierový filter, alebo sedimentáciou.

1.8.5. **Príprava vody doplnenej o sediment (voliteľné)**

Pre test suspendovaného sedimentu sa pridá povrchový sediment do baniek obsahujúcich prírodnú vodu (filtrovanú na účely odstránenia hrubých častíc, ako je uvedené v oddiele 1.8.4), aby sa získala suspenzia; koncentrácia suspendovaných tuhých látok musí byť medzi 0,01 a 1 g/L. Povrchový sediment musí pochádzať z rovnakého miesta, z ktorého bola odobratá vzorka vody. V závislosti od konkrétneho vodného prostredia môže byť povrchový sediment charakterizovaný buď vysokým obsahom organického uhlíka (2,5 % –7,5 %) a jemnou textúrou, alebo nízkym obsahom organického uhlíka (0,5 % –2,5 %) a hrubou textúrou (2). Povrchový sediment sa môže pripraviť takto: extrahujte niekoľko jadier sedimentov s použitím skúmavky z priesvitného plastu, odrežte vrchné aeróbne vrstvy (z povrchu do hĺbky max. 5 mm) hneď po odbere vzorky a spojte ich dohromady. Výsledná vzorka sedimentu sa musí prepravovať v nádobe s veľkou plynnou fázou, aby sa sediment udržiaval v aeróbnych podmienkach (ochlaďte na 4 °C, ak preprava trvá viac ako 2 až 3 hodiny). Vzorka sedimentu sa suspenduje v testovanej vode v pomere 1: 10 a do použitia sa udržiava pri 4 °C za prístupu vzduchu. Skladovanie sedimentu je v prípade potreby nevyhnutné minimalizovať a nesmie v žiadnom prípade prekročiť maximálne 4 týždne.

1.8.6. **Semikontinuálny postup (voliteľné)**

Môže byť potrebné predĺžiť inkubáciu (niekoľko mesiacov), ak sa vyskytuje dlhá lag fáza predtým, ako možno stanoviť významnú degradáciu testovanej látky. Ak je toto známe z predchádzajúceho testovania látky, test možno začať s použitím semikontinuálneho postupu, ktorý umožňuje pravidelné obnovovanie časti testovanej vody alebo suspenzie (pozri dodatok 2). Alternatívne sa môže bežný dávkový test zmeniť na semikontinuálny test, ak sa nedosiahne žiadna degradácia testovanej látky počas približne 60 dní testovania s použitím dávkového postupu (pozri druhý odsek v oddiele 1.8.8.3).

1.8.7. **Pridávanie testovanej (alebo referenčnej) látky**

Pre látky s vysokou rozpustnosťou vo vode (> 1 mg/L) a nízkou prchavosťou (Henryho konštanty < 1 $Pa \cdot m^3/mol$ alebo < 10^{-5} $atm \cdot m^3/mol$) sa môže pripraviť zásobný roztok v deionizovanej vode (pozri oddiel 1.8.2); do testovacích nádob sa pridá príslušný objem zásobného roztoku, aby sa dosiahla požadovaná koncentrácia. Je potrebné, aby bol objem každého pridaného zásobného roztoku čo možno najmenší (< 10 % konečného objemu kvapaliny, ak je to možné). Ďalší postup je rozpustiť testovanú látku vo väčšom objeme testovanej vody, ktorá môže byť alternatívou použitia organických rozpúšťadiel.

▼M1

Ak je to nevyhnutné, pripravia sa zásobné roztoky neprchavých látok s nízkou rozpustnosťou vo vode s použitím prchavého organického rozpúšťadla, ale množstvo pridaného rozpúšťadla do testovacieho systému nesmie byť vyššie ako 1 objemové % a nesmie mať škodlivé účinky na mikrobiálnu aktivitu. Rozpúšťadlo nesmie ovplyvniť stabilitu testovanej látky vo vode. Rozpúšťadlo sa musí odstrániť až do extrémne malého množstva tak, aby významne nezvýšilo koncentráciu DOC testovanej vody alebo suspenzie. Je to potrebné skontrolovať špecifickou analýzou pre látku alebo ak je možné, analýzou DOC (6). Je potrebné venovať pozornosť tomu, aby sa množstvo preneseného rozpúšťadla obmedzilo na čo najnižšiu potrebnú mieru, a zabezpečiť, aby sa množstvo testovanej látky dalo rozpustiť v konečnom objeme testovanej vody. Môžu sa použiť iné techniky na pridávanie testovanej látky do testovacích nádob, ako je uvedené v (7) a (8). Ak sa používa organické rozpúšťadlo na aplikáciu testovanej látky, s kontrolami s rozpúšťadlom obsahujúcimi testovanú vodu (bez žiadnych prídavných látok) a testovanú vodu s pridanou referenčnou látkou sa musí zaobchádzať rovnako ako s aktívnymi testovacími nádobami doplnenými o testovanú látku v nosiči, ktorým je rozpúšťadlo. Účelom kontrol s rozpúšťadlom je preskúmať prípadné škodlivé účinky na mikrobiálnu populáciu spôsobené rozpúšťadlom, ako naznačuje degradácia referenčnej látky.

1.8.8. **Testovacie podmienky**

1.8.8.1. *Teplota pri teste*

Inkubácia sa musí vykonávať v tme (prednostne) alebo v difúznom svetle pri regulovanej teplote (± 2 °C), čo môže byť teplota terénu alebo štandardná teplota 20 °C – 25 °C. Teplota terénu môže byť buď aktuálna teplota vzorky v čase odberu vzorky, alebo priemerná teplota terénu v mieste odberu.

1.8.8.2. *Miešanie*

Musí sa zabezpečiť miešanie nepretržitým trepaním alebo miešaním, aby sa zachovala suspenzia častíc a mikroorganizmov. Miešanie tiež uľahčuje prenos kyslíka z plynnej fázy do kvapaliny tak, že možno náležite zachovať aeróbne podmienky. Umiestnite banky na trepačku (trepanie približne pri 100 rpm) alebo použite magnetické miešanie. Miešanie musí byť nepretržité. Trepanie alebo miešanie musí byť čo najmiernejšie, avšak také, aby sa neustále zachovala homogénna suspenzia.

1.8.8.3. *Dĺžka testu*

Dĺžka testu obvykle nemá presiahnuť 60 dní, pokiaľ sa nepoužíva semikontinuálny postup s pravidelným obnovovaním testovanej suspenzie (pozri oddiel 1.8.6 a dodatok 2). Čas testu v prípade dávkového testu sa môže predĺžiť maximálne na 90 dní, ak sa degradácia testovanej látky začala počas prvých 60 dní. Degradácia sa monitoruje v príslušných časových intervaloch stanovením zvyškovej aktivity ^{14}C alebo uvoľneného $^{14}CO_2$ (pozri oddiel 1.8.9.4) a/alebo chemickou analýzou (oddiel 1.8.9.5). Inkubačný čas musí byť dostatočne dlhý na vyhodnotenie degradačného procesu. Prednostne by miera degradácie mala byť vyššia ako 50 %; pre pomaly degradovateľné látky miera degradácie musí byť dostatočná (obvykle vyššia ako 20 % degradácia) na zabezpečenie stanovenia kinetickej degradačnej rýchlostnej konštanty.

▼M1

V testovacom systéme sa musia vykonávať pravidelné merania koncentrácie pH a kyslíka, pokiaľ z predchádzajúcich skúseností z podobných testov so vzorkami vôd a sedimentu odobratých z rovnakého miesta nevyplýva zbytočnosť takýchto meraní. Za určitých podmienok by metabolizmus primárnych substrátov pri oveľa vyšších koncentráciách vo vode alebo sedimente mohol mať za následok dostatočné uvoľnenie CO_2 a vyčerpanie kyslíka, ktoré významne zmenia experimentálne podmienky počas testu.

1.8.9. **Postup**

1.8.9.1. *Príprava baniek na pelagický test*

Preneste príslušný objem testovanej vody do testovacích baniek, do približne jednej tretiny objemu banky a najmenej okolo 100 ml. Ak sa používajú viaceré banky (aby sa umožnilo zužitkovanie celých baniek v každom čase odberu vzoriek), je vhodný objem testovanej vody tiež približne 100 ml, keďže malé objemy vzoriek môžu ovplyvňovať dĺžku lag fázy. Testovaná látka sa pridáva zo zásobného roztoku, ako je uvedené v oddieloch 1.8.2 a 1.8.7. Je potrebné použiť minimálne dve rozdielne koncentrácie testovanej látky odlišujúce sa o faktor 5 až 10 na stanovenie kinetiky degradácie a výpočet kinetickej degradačnej rýchlostnej konštanty. Obe zvolené koncentrácie musia byť menšie ako 100 μg/L a prednostne v rozmedzí < 1 – 10 μg/L.

Uzavrite banky zátkami alebo uzávermi neprepúšťajúcimi vzduch a CO_2. Pre neprchavé testované chemické látky, neoznačené ^{14}C, sú vhodné voľné vatové zátky, ktoré zabraňujú kontaminácii z ovzdušia (pozri oddiel 1.8.1), za predpokladu, že všetky hlavné produkty degradácie sú známe ako neprchavé a ak sa používa nepriame stanovenie CO_2 (pozri dodatok 3).

Inkubujte banky pri zvolenej teplote (pozri oddiel 1.8.8.1). Na začiatku testu odoberte vzorky na chemickú analýzu alebo stanovenia ^{14}C (t. j. predtým ako sa začne biodegradácia; pozri oddiel 1.7.1) a potom v príslušných časových intervaloch v priebehu testu. Odber vzoriek sa môže vykonať odoberaním čiastočných vzoriek (napr. 5 ml alikvóty) z každej paralelky alebo zužitkovať celé banky v každom čase odberu vzoriek. Mineralizácia testovanej látky sa môže stanoviť buď nepriamo, alebo priamo (pozri dodatok 3). Obvykle je potrebných minimálne päť odberov počas degradačnej fázy (t. j. po ukončení lag fázy) na stanovenie spoľahlivej rýchlostnej konštanty, pokiaľ sa nedá odôvodniť, že pre rýchlo degradujúce látky sú postačujúce tri odbery. Pre látky, ktoré sa počas degradačnej fázy nedegradujú rýchlo, možno ľahko uskutočniť viac meraní, a preto sa na stanovenie k musí použiť viac experimentálnych bodov. Nedá sa stanoviť pevný harmonogram pre odber vzoriek, lebo rýchlosť biodegradácie je premenlivá, ale odporúča sa, ak je degradácia pomalá, odoberať vzorky raz do týždňa. Ak je testovaná látka rýchlo degradovateľná, odber vzoriek sa musí uskutočniť jedenkrát za deň počas prvých troch dní a potom každý druhý alebo tretí deň. Za určitých okolností, ako napr. v prípade veľmi rýchlo hydrolyzujúcich látok, môže byť potrebné odoberať vzorky v hodinových intervaloch. Odporúča sa, aby sa uskutočnila predbežná štúdia pred testom na stanovenie vhodných intervalov odberov vzoriek. Ak musia byť vzorky k dispozícii pre ďalšie špecifické analýzy, odporúča sa odobrať viac vzoriek a potom vybrať tie, ktoré sa budú analyzovať na konci pokusu na základe obrátenej stratégie, t. j. posledné vzorky sa analyzujú prvé (pozri druhý odsek v oddiele 1.8.9.5 pre pokyny o stabilite vzoriek počas skladovania).

▼**M1**

1.8.9.2. *Počet baniek a vzoriek*

Pripravte dostatočný počet testovacích baniek, aby ste mali k dispozícii:

— testovacie banky; minimálne dve banky pre každú koncentráciu testovanej látky (prednostne minimálne 3) alebo viac testovaných baniek pre každú koncentráciu, ak sa zužitkujú celé banky v každom čase odberu (označené ako F_T),

— testovacie banky pre výpočet hmotnostnej bilancie; minimálne dve banky pre každú koncentráciu testovanej látky (označené ako F_M),

— slepú kontrolu, bez testovanej látky; minimálne jedna čistá testovacia banka obsahujúca iba testovanú vodu (označené ako F_B),

— referenčnú kontrolu; dve paralelné banky s referenčnou látkou (napr. anilín alebo benzoát sodný s koncentráciou 10 μg/l) (označené ako F_C). Účelom referenčnej kontroly je potvrdiť minimálnu mikrobiálnu aktivitu. Ak je to vhodné, môže sa použiť radioaktívne označená referenčná látka aj vtedy, keď sa degradácia testovanej látky sleduje chemickou analýzou,

— sterilnú kontrolu; jedna alebo dve banky obsahujúce sterilizovanú testovanú vodu na preskúmanie prípadnej abiotickej degradácie alebo inej nebiologickej eliminácie testovanej látky (označené ako F_S). Biologickú aktivitu možno zastaviť autoklávovaním (121 °C; 20 min) testovanej vody alebo pridaním toxickej látky (napr. azid sodný (NaN_3) v množstve 10 – 20 g/l, chlorid ortuťnatý ($HgCl_2$) v množstve 100 mg/l alebo formalín v množstve 100 mg/l) alebo gamma žiarením. Ak sa použije $HgCl_2$, musí sa zneškodňovať ako toxický odpad. V prípade vody s veľkým množstvom pridaného sedimentu nie je jednoduché dosiahnuť sterilné podmienky; v takomto prípade sa odporúča opakované autoklávovanie (napr. trikrát). Je potrebné zohľadniť, že sa môžu počas autoklávovania zmeniť sorpčné vlastnosti sedimentu,

— kontroly rozpúšťadla obsahujúce testovanú vodu a testovanú vodu s referenčnou látkou; dve paralelné banky s rovnakým množstvom rozpúšťadla a s použitím rovnakého postupu, ako sa používa pri aplikácii testovanej látky. Účelom je preskúmať možné škodlivé účinky rozpúšťadla stanovením degradácie referenčnej látky.

Pri zostavovaní testu by výskumný pracovník mal zohľadniť relatívnu dôležitosť väčšieho počtu paraleliek v pokuse v porovnaní so zvýšeným počtom časov odberu. Presné číslo baniek bude závisieť od použitej metódy na stanovenie degradácie (pozri tretí odsek v oddiele 1.8.9.1, odsek 1.8.9.4 a dodatok 3).

▼M1

V každom čase odberu sa musia odobrať z každej testovanej banky dve čiastočné vzorky (napr. 5 ml alikvóty). Ak sa použije viac baniek, aby sa umožnilo zbieranie celých baniek, musia sa obetovať minimálne dve banky v každom čase odberu (pozri prvý odsek v oddiele 1.8.9.1).

1.8.9.3. *Príprava baniek na test suspendovaného sedimentu [voliteľné]*

Pridajte potrebné objemy testovanej vody a sedimentu, ak je potrebné, do testovacích nádob (pozri oddiel 1.8.5). Príprava baniek pre test suspendovaného sedimentu je rovnaká ako pre pelagický test (pozri oddiely 1.8.9.1 a 1.8.9.2). Použite prednostne sérové fľašky alebo banky podobného tvaru. Umiestnite uzatvorené banky na trepačku horizontálne. Otvorené banky pre neprchavé látky a neoznačené ^{14}C je potrebné umiestniť vo zvislej polohe; v tomto prípade sa odporúča magnetické miešanie s použitím magnetických miešadielok pokrytých sklom. V prípade potreby fľašky prevzdušnite, aby boli zachované správne aeróbne podmienky.

1.8.9.4. *Rádiochemické stanovenia*

Uvoľnený $^{14}CO_2$ sa stanovuje nepriamo a priamo (pozri dodatok 3). $^{14}CO_2$ sa stanovuje nepriamo na základe rozdielu medzi počiatočnou aktivitou ^{14}C v testovanej vode alebo suspenzii a celkovou zvyškovou aktivitou v čase odberu vzorky meranej po okyslení vzorky na pH 2 – 3 a odstránení CO_2. Anorganický uhlík sa tým odstráni a meraná zvyšková aktivita pochádza z organického materiálu. Nepriame stanovenie $^{14}CO_2$ sa nesmie použiť, ak počas transformácie testovanej látky vznikajú prchavé hlavné produkty transformácie (pozri dodatok 3). Ak je to možné, je potrebné merať uvoľnenie $^{14}CO_2$ priamo (pozri dodatok 3) v každom čase odberu vzoriek aspoň v jednej testovacej banke; tento postup umožňuje kontrolu hmotnostnej bilancie aj procesu biodegradácie, ale je obmedzený na testy uskutočnené s uzatvorenými bankami.

Ak sa stanovuje uvoľnený $^{14}CO_2$ priamo počas testu, musí sa na tento účel na začiatku testu pripraviť viac baniek. Odporúča sa priame stanovenie $^{14}CO_2$, ak počas transformácie testovanej látky vznikajú prchavé hlavné produkty transformácie. V každom bode merania sa okyslia ďalšie testovacie banky na pH 2 – 3 a $^{14}CO_2$ sa zhromaždí v internom alebo externom absorbéri (pozri dodatok 3).

Prípadne sa koncentrácie testovanej látky označenej ^{14}C a hlavné produkty transformácie môžu stanoviť s použitím rádiochromatografie (napr. chromatografia na tenkej vrstve, RAD-TLC) alebo HPLC s rádiochemickou detekciou.

Prípadne sa môže stanoviť fázové rozdelenie zvyškovej rádioaktivity (pozri dodatok 1) a zvyšnej testovanej látky a môžu sa stanoviť produkty transformácie.

▼**M1**

Na konci testu sa musí stanoviť hmotnostná bilancia priamym meraním $^{14}CO_2$ s použitím oddelených testovacích baniek, z ktorých sa počas testu neodoberú žiadne vzorky (pozri dodatok 3).

1.8.9.5. *Špecifická chemická analýza*

Ak je k dispozícii citlivá špecifická analytická metóda, primárna biodegradácia sa môže namiesto použitia techník rádioaktívneho označovania vyhodnotiť meraním celkovej zvyškovej koncentrácie testovanej látky. Ak sa používa rádioaktívne označená testovaná látka (na meranie celkovej mineralizácie), môže sa paralelne uskutočniť špecifická chemická analýza, aby poskytla ďalšie užitočné informácie, a na kontrolu postupu. Špecifická chemická analýza sa môže tiež použiť na meranie transformácie produktov, ktoré sa tvoria počas degradácie testovanej látky, a to sa odporúča pre látky, ktoré sa mineralizujú, s polčasmi viac ako 60 dní. Koncentrácia testovanej látky a produktov transformácie pri každom odbere sa stanoví a zaznamená (ako koncentrácia a ako percentuálny podiel použitého množstva). Vo všeobecnosti sa produkty transformácie stanovené pri ≥ 10 % použitej koncentrácie v ktoromkoľvek čase odberu vzoriek musia identifikovať, pokiaľ neexistuje iný riadne odôvodnený postup. Produkty transformácie, pre ktoré sa koncentrácie trvale zvyšujú počas štúdie, sa tiež posúdia na účely identifikácie, aj keď ich koncentrácie nepresahujú vyššie uvedené limity, lebo to môže byť dôkazom perzistencie. Je potrebné zvážiť analýzu produktov transformácie v sterilných kontrolkách, ak sa usudzuje, že by bola možná rýchla abiotická transformácia testovanej látky (napr. hydrolýza). Podľa jednotlivých prípadov je potrebné uvážiť potrebu kvantifikácie a identifikácie a v správe sa uvedú odôvodnenia. Extrakčné techniky s organickým rozpúšťadlom sa musia použiť podľa pokynov v príslušnom analytickom postupe.

Všetky vzorky sa musia skladovať pri 2 °C až 4 °C a bez prístupu vzduchu, ak sa analýza uskutoční do 24 hodín (prednostne). V prípade dlhšieho skladovania sa vzorky zmrazia pod – 18 °C alebo sa chemicky zakonzervujú. Acidifikácia ako metóda na konzerváciu vzoriek sa neodporúča, pretože acidifikované vzorky môžu byť nestabilné. Ak sa vzorky neanalyzujú do 24 hodín a skladujú sa dlhšie, je potrebné uskutočniť štúdiu stability počas skladovania, aby sa dokázala stabilita chemických látok, pri skladovaní pod – 18 °C alebo v podmienkach konzervácie. Ak analytická metóda obsahuje buď extrakciu rozpúšťadla, alebo extrakciu tuhej fázy (ETF), extrakcia sa musí uskutočniť hneď po odbere vzoriek alebo po uskladnení vzoriek v chladničke maximálne 24 hodín.

V závislosti od citlivosti analytickej metódy môžu byť potrebné väčšie objemy vzoriek, ako sú uvedené v odseku 16. Test sa môže jednoducho vykonať s jednolitrovými testovanými objemami v 2 – 3-litrových bankách, ktoré umožňujú odber približne 100 ml vzoriek.

▼M1

2. **ÚDAJE A SPRÁVY**

2.1. SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

2.1.1. **Grafické zaznamenanie údajov**

Zaokrúhlite časy odberu na celé hodiny (pokiaľ sa látka podstatne nedegraduje za niekoľko minút až hodín), ale nie na celé dni. Graficky zaznamenajte odhady zvyškovej aktivity testovanej látky (pre látky označené ^{14}C) alebo zvyškovú koncentráciu (pre neoznačené látky) proti času v lineárnom aj v semilogaritmickom grafe (pozri obrázky 1a, 1b). Ak prebieha degradácia, porovnajte výsledky z baniek F_T s výsledkami z baniek F_S. Ak sa stredné hodnoty výsledkov z baniek s testovanou látkou (F_T) a sterilných baniek (F_S) odchyľujú o menej ako 10 %, dá sa predpokladať, že pozorovaná degradácia je hlavne abiotická. Ak je degradácia v bankách F_S nižšia, môžu sa použiť čísla na korekciu čísel získaných z baniek F_T (odpočítaním) na odhad miery biodegradácie. Ak sa uskutočnia voliteľné analýzy pre hlavné produkty transformácie, je potrebné okrem grafu rozkladu testovanej látky poskytnúť grafy znázorňujúce ich tvorbu a rozklad.

Stanovte dĺžku lag fázy t_L z degradačnej krivky (semilogaritmický graf) extrapoláciou jej lineárnej časti na nulovú degradáciu alebo alternatívne stanovením času pre približne 10 % degradáciu (pozri obrázky 1a a 1b). Zo semilogaritmického grafu stanovte rýchlostnú konštantu prvého poriadku k a jej štandardnú chybu lineárnou regresiou ln (zvyškovej aktivity ^{14}C alebo koncentrácie testovanej látky) proti času. Pomocou predovšetkým meraní ^{14}C použite iba údaje prislúchajúce počiatočnej lineárnej časti krivky po ukončenej lag fáze a uprednostnite skôr výber menšieho množstva údajov, ktoré sú reprezentatívne, pred výberom väčšieho množstva nespoľahlivejších údajov. Nespoľahlivosť sa v tomto prípade týka chýb súvisiacich s odporúčaným priamym použitím nameraných zvyškových aktivít ^{14}C (pozri nižšie). Niekedy môže byť potrebné vypočítať dve odlišné rýchlostné konštanty, ak degradácia prebieha podľa bifázického modelu. Na tento účel sa definujú dve odlišné fázy degradačnej krivky. Pre každú jednu paralelnú banku sa musia urobiť výpočty rýchlostnej konštanty k a polčasu $t_{½} = ln2/k$, ak sa odoberajú čiastočné vzorky z rovnakej banky, alebo s použitím priemerných hodnôt, ak sa zužitkujú celé banky v každom čase odberu (pozri posledný odsek v oddiele 1.8.9.2). Ak sa použije prvý uvedený postup, je potrebné uviesť v správe rýchlostnú konštantu a polčas pre každú jednu paralelnú banku ako priemernú hodnotu so štandardnou chybou. Ak sa použili vysoké koncentrácie testovanej látky, degradačná krivka sa môže značne odchýliť od rovnej čiary (semilogaritmický graf) a kinetika prvého poriadku nemusí platiť. Preto nemá zmysel definovať polčas. V prípade obmedzeného rozsahu údajov sa však môže použiť kinetika pseudoprvého poriadku a stanoviť polčas degradácie DT_{50} (čas dosiahnutia 50 % degradácie). Je potrebné však pamätať na to, že časový priebeh degradácie mimo zvoleného rozsahu údajov sa nedá predpovedať s použitím DT_{50}, ktorý je iba deskriptorom daného súboru údajov. Analytické nástroje na uľahčenie štatistických výpočtov a na zostrojenie krivky sú ľahko dostupné a odporúča sa používať tento druh softvéru.

▼M1

Ak sa vykonáva špecifická chemická analýza, stanovte rýchlostné konštanty a polčasy pre primárnu degradáciu, ako je uvedené vyššie pre celkovú mineralizáciu. Ak primárna degradácia je ohraničeným procesom, môžu sa použiť experimentálne údaje z celého priebehu degradácie. Je to preto, že merania sú na rozdiel od meraní aktivity ^{14}C priame.

Ak sa použijú látky označené ^{14}C, aspoň na konci testu sa musí vyjadriť hmotnostná bilancia ako percento použitej začiatočnej koncentrácie.

2.1.2. **Zvyšková aktivita**

Ak sa biologicky degraduje časť organickej látky označená ^{14}C, hlavná časť ^{14}C sa premení na $^{14}CO_2$, zatiaľ čo ďalšia časť sa využije na rast biomasy a/alebo syntézu mimobunkových metabolitov. Z tohto dôvodu úplná „konečná“ biodegradácia látky nemá za následok 100 % konverziu uhlíka na $^{14}CO_2$. ^{14}C zabudovaný do produktov vytvorených biosyntézou sa následne pomaly uvoľňuje ako $^{14}CO_2$ pre „sekundárnu mineralizáciu“. Z týchto dôvodov sa v grafických znázorneniach zvyškovej organickej aktivity ^{14}C (meranej po uvoľnení CO_2) alebo $^{14}CO_2$ proti času po ukončení degradácie ukazuje „chvostovanie“. To sťažuje kinetickú interpretáciu údajov a z tohto dôvodu by sa na stanovenie degradačnej rýchlostnej konštanty mala obvykle použiť iba začiatočná časť krivky (po ukončení lag fázy a predtým, ako sa dosiahne približne 50 % degradácie). Ak sa degraduje testovaná látka, celková zvyšková aktivita organického ^{14}C je vždy vyššia ako aktivita ^{14}C spojená so zvyšnou intaktnou testovanou látkou. Ak sa testovaná látka degraduje reakciou prvého poriadku a konštantná časť α sa mineralizuje na CO_2, počiatočný sklon krivky úbytku ^{14}C (celkový organický ^{14}C proti času) bude α časy sklonu príslušnej krivky pre koncentráciu testovanej látky (alebo aby sme boli presní, časť testovanej látky označenej ^{14}C). Na základe meraní celkovej nekorigovanej aktivity organického ^{14}C bude preto vypočítaná degradačná rýchlostná konštanta konzervatívna. Postupy na stanovenie koncentrácií testovanej látky z nameraných rádiochemických aktivít, založené na rôznych zjednodušujúcich predpokladoch, sú uvedené v odkazoch (2) (9) (10) (11). Takéto postupy sa najjednoduchšie používajú pre rýchlo degradovateľné látky.

2.2. INTERPRETÁCIA VÝSLEDKOV

Ak sa zistí, že k je nezávislá od pridanej koncentrácie (t. j. ak vypočítané k je približne rovnaké ako pri rôznych koncentráciách testovanej látky), dá sa predpokladať, že rýchlostná konštanta prvého poriadku je reprezentatívna pre použité testovacie podmienky, t. j. testovanú látku, vzorku vody a teplotu pri teste. To, do akej miery sa dajú výsledky zovšeobecniť alebo extrapolovať na iné systémy, sa musí odborne posúdiť. Ak sa použije vysoká koncentrácia testovanej látky a degradácia preto neprebieha podľa kinetiky prvého poriadku, údaje sa nedajú použiť na priame stanovenie rýchlostnej konštanty prvého poriadku alebo príslušný polčas. Údaje odvodené z testu s použitím vysokej koncentrácie testovanej látky sa môžu ešte stále použiť na stanovenie stupňa celkovej mineralizácie a/alebo na detekciu a kvantifikáciu produktov transformácie.

▼M1

Ak sú známe rýchlosti iných procesov úbytku ako biodegradácia (napr. hydrolýza alebo prchavosť), môžu sa odpočítať od čistej rýchlosti úbytku zistenej počas testu na stanovenie približného odhadu rýchlosti biodegradácie. Údaje pre hydrolýzu sa môžu získať napr. zo sterilnej kontroly alebo z paralelného testovania s použitím vyššej koncentrácie testovanej látky.

Nepriame a priame stanovenie $^{14}CO_2$ (oddiel 1.8.9.4 a dodatok 3) možno použiť iba na meranie miery mineralizácie testovanej látky na CO_2. Rádiochromatografia (RAD-TLC) alebo HPLC sa môžu použiť na analyzovanie koncentrácií testovanej látky označenej ^{14}C a vzniku hlavných produktov transformácie (tretí odsek v oddiele 1.8.9.4). Na umožnenie priameho stanovenia polčasu je potrebné, aby neboli prítomné žiadne hlavné produkty transformácie (definované ako $\geq$ 10 % použitého množstva testovanej látky). Ak sú prítomné hlavné produkty transformácie, ako sa tu definuje, je potrebné podrobné vyhodnotenie údajov. Toto môže zahŕňať opakované testovanie a/alebo identifikáciu produktov transformácie (pozri prvý odsek v oddiele 1.8.9.5), pokiaľ osud produktov transformácie nemožno logicky vyhodnotiť na základe skúseností (napr. informácie o ceste degradácie). Keďže sa pomer uhlíka testovanej látky premenenej na CO_2 mení (v závislosti zväčša od koncentrácie testovanej látky a iných dostupných substrátov, testovacích podmienok a mikrobiálneho spoločenstva), tento test neumožňuje priame stanovenie konečnej biodegradácie ako v DOC die-away teste, ale výsledok je podobný výsledku získanému respirometrickým testom. Stupeň mineralizácie bude teda nižší alebo rovnajúci sa minimálnej úrovni konečnej biodegradácie. Na získanie úplnejšieho obrazu konečnej biodegradácie (mineralizácie a zabudovania do biomasy) sa na konci testu musí vykonať analýza fázového rozdelenia ^{14}C (pozri dodatok 1). ^{14}C v podiele častíc bude pozostávať z ^{14}C zabudovaného do bakteriálnej biomasy a ^{14}C adsorbovaného na organické častice.

2.3. PLATNOSŤ TESTU

Ak sa referenčná látka nedegraduje v predpokladom časovom intervale (pre anilín a benzoát sodný obvykle menej ako dva týždne), platnosť testu je spochybnená a musí sa ďalej preveriť alebo sa alternatívne test musí zopakovať s novou vzorkou vody. V kruhovom teste ISO metódy, na ktorom sa zúčastnilo sedem laboratórií z Európy, prevzali degradačné rýchlostné konštanty pre anilín v rozmedzí 0,3 až 1,7 deň$^{-1}$ s priemerom 0,8 d^{-1} pri 20 °C a štandardnou chybou ± 0,4 d^{-1} ($t_{½}$ = 0,9 dňa). Typické lag fázy boli 1 až 7 dní. Uviedlo sa, že skúmané vody mali bakteriálnu biomasu zodpovedajúcu 10^3 -10^4 jednotkám tvoriacim kolónie (CFU) na ml. Degradačné rýchlosti v stredoeurópskych vodách bohatých na živiny boli vyššie ako v severských oligotrofických vodách, čo môže byť kvôli odlišnému trofickému stavu alebo prechádzajúcemu vystaveniu chemickým látkam.

Celková výťažnosť (hmotnostná bilancia) na konci pokusu musí byť medzi 90 % a 110 % pre radioaktívne označené látky, pričom počiatočná výťažnosť na začiatku pokusu musí byť medzi 70 % a 110 % pre neoznačené látky. Uvedené rozsahy je však potrebné interpretovať len ako ciele a nemali by sa používať ako kritériá pre akceptáciu testu.

▼M1

3. **SPRÁVA O TESTE**

Typ štúdie, t. j. pelagický alebo test suspendovaného sedimentu, sa musia jasne stanoviť v správe z testu, ktorá musí obsahovať minimálne tieto informácie:

Testovaná látka a referenčná látka(y):

— všeobecné názvy, chemické názvy (odporúčané názvy IUPAC a/alebo názvy CAS), čísla CAS, štrukturálne vzorce (uvádzajúce pozíciu označenia ^{14}C, ak sa používa rádioaktívne označená látka) a príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti testu a referenčnej látky (pozri oddiely 1.5 a 1.6),

— všeobecné názvy, čísla CAS, štrukturálne vzorce (uvádzajúce pozíciu označenia ^{14}C, ak sa používa rádioaktívne označená látka) a príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti látok použitých ako štandardy na identifikáciu produktov transformácie,

— čistota (nečistoty) testovaných a referenčných látok,

— rádiochemická čistota označenej chemickej látky a špecifická aktivita (v prípade potreby).

Povrchová voda:

Musia sa poskytnúť minimálne tieto informácie pre odobratú vzorku vody:

— umiestnenie a opis miesta odberu vzoriek vrátane predchádzajúcej kontaminácie, ak je to možné,

— dátum a miesto odberu vzoriek,

— živiny (celkový N, amónne ióny, dusitany, dusičnany, celkový P, rozpustené ortofosfáty),

— hĺbka odberu,

— vzhľad vzorky (napr. farba a zákal),

— DOC a TOC,

— BSK,

— teplota a pH v mieste a čase odberu,

— kyslík alebo redoxný potenciál (povinné iba vtedy, ak nie sú zrejmé aeróbne podmienky),

— slanosť alebo vodivosť (v prípade morskej vody a poloslanej vody),

— suspendované tuhé látky (v prípade zakalenej vzorky),

— prípadne ďalšie informácie o mieste odberu v čase odberu (napr. aktuálne alebo predchádzajúce údaje o rýchlosti toku riek alebo morských prúdov, hlavné vypúšťania v blízkosti a typ vypúšťaní, poveternostné podmienky pred časom odberu)

a prípadne:

— mikrobiálna biomasa (napr. priame stanovenie metódou farbenia akridínovou oranžovou alebo jednotky tvoriace kolónie),

▼M1

— anorganický uhlík,

— koncentrácia chlorofylu-a ako špecifické stanovenie biomasy rias.

Okrem toho sa poskytnú tieto informácie o sedimente, ak sa uskutočňuje test suspendovaného sedimentu:

— hĺbka odberu sedimentu,

— vzhľad sedimentu (napr. sfarbený, bahnitý, prachový alebo pieskový),

— textúra (napr. % hrubého piesku, jemného piesku, siltu a ílu),

— sušina v g/l suspendovaných tuhých látok, koncentrácia TOC alebo úbytok hmotnosti žíhaním ako kritérium obsahu organickej látky,

— pH,

— kyslík alebo redoxný potenciál (povinné iba, ak nie sú zrejmé aeróbne podmienky).

Testovacie podmienky:

— čas medzi odberom a s použitím v laboratórnom teste, skladovanie vzoriek a predpríprava vzorky, dátumy uskutočnenia štúdií,

— množstvo použitej testovanej látky, testovaná koncentrácia a referenčná látka,

— metóda aplikácie testovanej látky vrátane každého použitia rozpúšťadiel,

— objem použitej povrchovej vody a sedimentu (ak sa používa) a odobratý objem v každom intervale na analýzu,

— opis použitého testovacieho systému,

ak sa nemôžu dodržať podmienky uchovávania v tme, informácie o podmienkach „difúzneho svetla“,

— informácie o metóde(-ach) použitých na zabezpečenie sterilných podmienok (napr. teplota, čas a počet autoklávovaní),

— inkubačná teplota,

— informácie o analytických technikách a metóde(-ach) použitých na rádiochemické merania a na kontrolu hmotnostnej bilancie a stanovenia fázového rozdelenia (ak sa vykonáva),

— počet paraleliek.

Výsledky:

— výťažnosť v percentách (pozri oddiel 1.7.1),

— opakovateľnosť a citlivosť použitých analytických metód vrátane detekčného limitu (LOD) a limitu kvantifikácie (LOQ) (pozri oddiel 1.7.2),

▼M1

— všetky namerané údaje (vrátane časov odberu) a vypočítané hodnoty v tabuľkovej forme a degradačné krivky pre každú testovanú koncentráciu a pre každú paralelnú banku; zaznamenajte lineárny korelačný koeficient pre sklon logaritmického grafu, stanovenú lag fázu a rýchlostnú konštantu prvého poriadku alebo pseudoprvého poriadku (ak je to možné) a príslušný polčas degradácie (alebo polčas, t_{50}),

— zaznamenajte príslušné hodnoty ako priemery výsledkov zistených v jednotlivých paralelkách, napr. dĺžku lag fázy, degradačnú rýchlostnú konštantu a polčas degradácie (alebo t_{50}),

— kategorizujte systém ako neadaptovaný alebo adaptovaný na základe vzhľadu degradačnej krivky a prípadného vplyvu testovanej koncentrácie,

— výsledky konečnej kontroly hmotnostnej bilancie a výsledky stanovení fázového rozdelenia (ak sa uskutočnili),

— frakcia mineralizovaného ^{14}C a v prípade použitia špecifickej analýzy konečná úroveň primárnej degradácie,

— identifikácia, molárna koncentrácia a percento použitých a hlavných produktov transformácie (pozri prvý odsek v oddiele 1.8.9.5) v prípade potreby,

— navrhovaná cesta transformácie v prípade potreby,

— diskusia o výsledkoch.

4. POUŽITÁ LITERATÚRA

1. OECD TG 309 (2004) Aerobic Mineralisation in surface water – Simulation Biodegradation Test.

2. ISO/DIS 14592 – 1 (1999) Water quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations – Part 1: Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

3. Testing Method C.23. Aerobic and anaerobic transformation in soil.

4. Testing Method C.24. Aerobic and anaerobic transformation in aquatic sediments.

5. OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris.

6. ISO 8245 (1999). Water quality – Guidelines on the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC).

7. ISO 10634 (1995). Water quality – Guidance for the preparation and treatment of poorly water-soluble organic compounds for the subsequent evaluation of their biodegradability in an aqueous medium.

8. OECD draft (2000). Guidance Document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures. Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment. No 22 (to be published summer 2000).

▼**M1**

9. Simkins, S. and Alexander, M. (1984). Models for mineralization kinetics with the variables of substrate concentration and population density. Appl. Environ. Microbiol.47, 394 – 401.

10. Ingerslev, F. and N. Nyholm. (2000). Shake-flask test for determination of biodegradation rates of ^{14}C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. Ecotoxicol. Environ. Saf. 45, 274 – 283.

11. ISO/CD 14592 – 1 (1999). Ring test report: Water Quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 – report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/-sediment suspensions.

▼M1

Dodatok 1

Fázové rozdelenie ^{14}C

Na kontrolu postupu sa musí bežné stanovenie celkovej zvyškovej organickej aktivity ^{14}C (TOA) doplniť meraniami hmotnostnej bilancie zahŕňajúcej priame stanovenie uvoľneného $^{14}CO_2$ po zachytení na absorbéri (pozri dodatok 3). Pozitívny vznik $^{14}CO_2$ je sám osebe priamym dôkazom biodegradácie na rozdiel od abiotickej degradácie alebo iných mechanizmov úbytku, ako napr. prchavosť a sorpcia. Ďalšie užitočné informácie charakterizujúce priebeh biodegradovateľnosti možno získať z meraní distribúcie TOA medzi rozpusteným stavom (aktivita rozpusteného organického ^{14}C, DOA) a časticovým stavom (časticová aktivita organického ^{14}C, POA) po oddelení častíc membránovou filtráciou alebo odstredením. POA pozostáva z testovanej látky naadsorbovanej na mikrobiálnu biomasu a na iné častice testovanej látky okrem uhlíka, ktorý sa použil na syntézu nového bunkového materiálu a tak zabudoval do časticovej frakcie biomasy. Vznik rozpusteného ^{14}C organického materiálu sa dá stanoviť ako DOA na konci biodegradácie (plató na krivke degradácie proti času).

Stanovenie fázového rozdelenia zvyškového ^{14}C vo vybratých vzorkách filtrovaním vzoriek na 0,22 μm alebo 0,45 μm membránovom filtri z materiálu, ktorý neadsorbuje významné množstvá testovanej látky (môžu byť vhodné polykarbonátové filtre). Ak je adsorpcia testovanej látky na filter príliš veľká na to, aby sa nemusela zohľadniť (je to potrebné skontrolovať pred pokusom), môže sa použiť namiesto filtrácie centrifugácia pri vysokej rýchlosti (2 000 g; 10 min.).

Pokračujte s filtrátom alebo s odstredenou zložkou, ako je uvedené v dodatku 3 pre nefiltrované vzorky. Rozpustite membránové filtre vo vhodnej scintilačnej kvapaline a merajte ako obvykle, bežne len pomerovou metódou s externým štandardom na korekciu zhášania, alebo použite okysličovadlo vzoriek. Ak sa použila centrifugácia, resuspendujte pelet vzniknutý z frakcie častíc v 1 – 2 ml destilovanej vody a preneste do scintilačnej fľaštičky. Potom s použitím 1 ml destilovanej vody dvakrát premyte a preneste premývaciu vodu do fľaštičky. V prípade potreby sa suspenzia môže zaliať do gélu na meranie kvapalinovým scintilačným počítačom.

▼M1

Dodatok 2

PoloKontinuálny postup

Môže byť potrebné predĺžiť inkubáciu na niekoľko mesiacov na dosiahnutie dostatočnej degradácie látok, ktoré sa ťažko odbúravajú. Dĺžka testu nesmie byť obvykle dlhšia ako 60 dní, pokiaľ nie sú zachované vlastnosti pôvodnej vzorky vody obnovením testovanej suspenzie. Čas testu sa však môže predĺžiť maximálne na 90 dní bez obnovenia testovanej suspenzie, ak sa degradácia testovanej látky začala počas prvých 60 dní.

Počas dlhodobej inkubácie sa diverzita mikrobiálneho spoločenstva môže obmedziť kvôli mechanizmom úbytku a kvôli prípadnému úbytku základných živín a primárnych uhlíkových substrátov vo vzorke vody. Preto sa odporúča, aby sa použil semikontinuálny test na príslušné stanovenie rýchlosti degradácie látok, ktoré sa pomaly degradujú. Test je potrebné začať s použitím semikontinuálneho postupu, ak sa na základe predchádzajúcich skúseností predpokladá, že na dosiahnutie 20 % degradácie látky bude potrebný inkubačný čas tri mesiace. Alternatívne sa môže bežný dávkový test zmeniť na semikontinuálny test, ak sa nedosiahne žiadna degradácia testovanej látky počas približne 60 dní testovania s použitím dávkového postupu. Semikontinuálny postup sa môže zastaviť a test pokračuje ako dávkový pokus, keď sa zaznamená významná degradácia (napr. > 20 %).

V polokontinuálnom teste sa každé dva týždne nahradí približne jedna tretina objemu testovanej suspenzie čerstvo odobratou vodou s testovanou látkou, ktorá sa pridá do počiatočnej koncentrácie. Ak sa vykonáva test suspendovaného sedimentu, podobne sa do vody pridá sediment na nahradenie do počiatočnej koncentrácie (medzi 0,01 a 1 g/l). Pri uskutočňovaní testu so suspendovanými tuhými látkami je dôležité, aby sa zachoval plne suspendovaný systém aj počas obnovenia vody a aby bol rezidenčný čas rovnaký pre tuhé látky a vodu, lebo v opačnom prípade sa môže stratiť plánovaná podobnosť s homogénnym vodným systémom bez ustálených fáz. Z týchto dôvodov sa uprednostňuje počiatočná koncentrácia suspendovaných sedimentov v spodnom rozsahu špecifikovaného intervalu, ak sa používa semikontinuálny postup.

Predpísané pridanie testovanej látky znamená, že sa počiatočná koncentrácia testovanej látky čiastočným obnovením testovanej suspenzie neprekročí, a teda sa zabráni adaptácii, ktorá sa často pozoruje pri vysokých koncentráciách testovanej látky. Keďže postup zahŕňa reinokuláciu aj nahradenie vyčerpaných živín a primárnych substrátov, pôvodná mikrobiálna diverzita sa obnoví a trvanie testu sa môže v podstate predlžovať až do nekonečna. Ak sa používa semikontinuálny postup, je dôležité pripomenúť, že sa zvyšková koncentrácia testovanej látky musí korigovať o množstvá pridanej a odstránenej testovanej látky pri každom obnovení. Pre látky, ktoré sa zle adsorbujú, sa môže používať celková koncentrácia alebo koncentrácia rozpustenej testovanej látky. Adsorpcia je minimálna (< 5 %) za špecifických podmienok (0,1 – 1 g tuhých látok/l) pre látky s log Kow < 3 (platí pre neutrálne, lipofilné zlúčeniny). Toto je vyjadrené v nasledujúcom príklade výpočtu: 0,1 g/l tuhých látok približne zodpovedá 10 mg uhlíka na liter (frakcia uhlíka, f_C = 0,01). Za predpokladu, že

Log K_{ow} (testovanej látky) = 3

$K_{oc} = 0{,}42 \times K_{ow}$

rozdeľovací koeficient, $K_d = f_C \times K_{oc}$,

potom rozpustená frakcia celkovej koncentrácie (C-voda (C_w)/C-celková (C_t) je:

$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1(1 + K_{oc} \times f_C \times SS) = 1/(1 + 0{,}42 \times 10^3 \times 0{,}01 \times 0{,}1 \times 10^{-3}) = 0{,}999$

▼M1

Dodatok 3

Stanovenie $^{14}CO_2$

Nepriame stanovenie $^{14}CO_2$

Pre bežné merania je nepriama metóda obvykle najmenej časovo náročnou a najpresnejšou metódou, ak je testovaná látka neprchavá a netransformuje sa na prchavé produkty transformácie. Preneste jednoducho nefiltrované vzorky, napr. veľkosti 5 ml, do scintilačných fľaštičiek. Na začiatku je vhodná aktivita vo vzorkách 5 000 dpm – 10 000 dpm (80 – 170 Bq) a minimálna počiatočná aktivita je okolo 1 000 dpm. CO_2 sa musí odstrániť po okyslení na pH 2 – 3 1 – 2 kvapkami koncentrovanej H_3PO_4 alebo HCl. Odstránenie CO_2 možno uskutočniť prebublávaním vzduchom počas približne ½ – 1 hodiny. Alternatívne sa môžu fľaštičky prudko trepať 1 – 2 hodiny (napríklad na mikrotrepačke) alebo za miernejšieho trepania cez noc. Účinnosť postupu odstraňovania CO_2 sa musí skontrolovať (predĺžením času prevzdušňovania alebo trepania). Potom sa musí pridať scintilačná kvapalina vhodná na meranie vodných vzoriek, vzorka sa homogenizuje vo vírivom mixéri a rádioaktivita sa stanoví meraním kvapalinovým scintilačným počítačom a odpočítaním aktivity pozadia zistenej v slepých vzorkách (F_B). Pokiaľ nie je testovaná voda príliš sfarbená alebo neobsahuje vysokú koncentráciu častíc, vykazujú vzorky obvykle rovnaké zhášanie a bude postačujúce uskutočniť korekcie zhášania s použitím externého štandardu. Ak je testovaná voda veľmi sfarbená, môže byť potrebná korekcia zhášania pridaním vnútorného štandardu. Ak je vysoká koncentrácia častíc, nemusí sa dať dosiahnuť homogénny roztok alebo gél alebo môžu sa vyskytnúť veľké odchýlky medzi vzorkami v zhášaní. V tomto prípade sa môže použiť metóda merania opísaná nižšie pre testované suspenzie. Ak sa test vykonáva ako test suspendovaného sedimentu, meranie $^{14}CO_2$ by sa mohlo uskutočniť nepriamo odobratím homogénnej 10 ml vzorky testovanej vody/suspenzie a oddelením fáz centrifugáciou pri vhodnej rýchlosti (napr. 15 min. pri 40 000 m/-s^2). Vodná fáza sa potom spracuje, ako je uvedené vyššie. Aktivita ^{14}C vo fáze častíc (POA) sa stanoví resuspendovaním sedimentu do malého objemu destilovanej vody, prenosom do scintilačných fľaštičiek a pridaním scintilačnej kvapaliny na vytvorenie gélu (na tento účel sú dostupné špeciálne scintilačné kvapaliny). V závislosti od charakteru častíc (napr. aký majú obsah organického materiálu), môže byť vhodné natráviť vzorku cez noc solubilizérom tkanív a potom pred pridaním scintilačnej kvapaliny homogenizovať vo vírivom mixéri. Alternatívne sa môže stanoviť POA spaľovaním v nadbytku kyslíka s použitím okysličovadla vzoriek. Pri meraní sa musia vždy pridať vnútorné štandardy a môže byť potrebné uskutočniť korekcie zhášania pridaním vnútorného štandardu pre každú jednu vzorku.

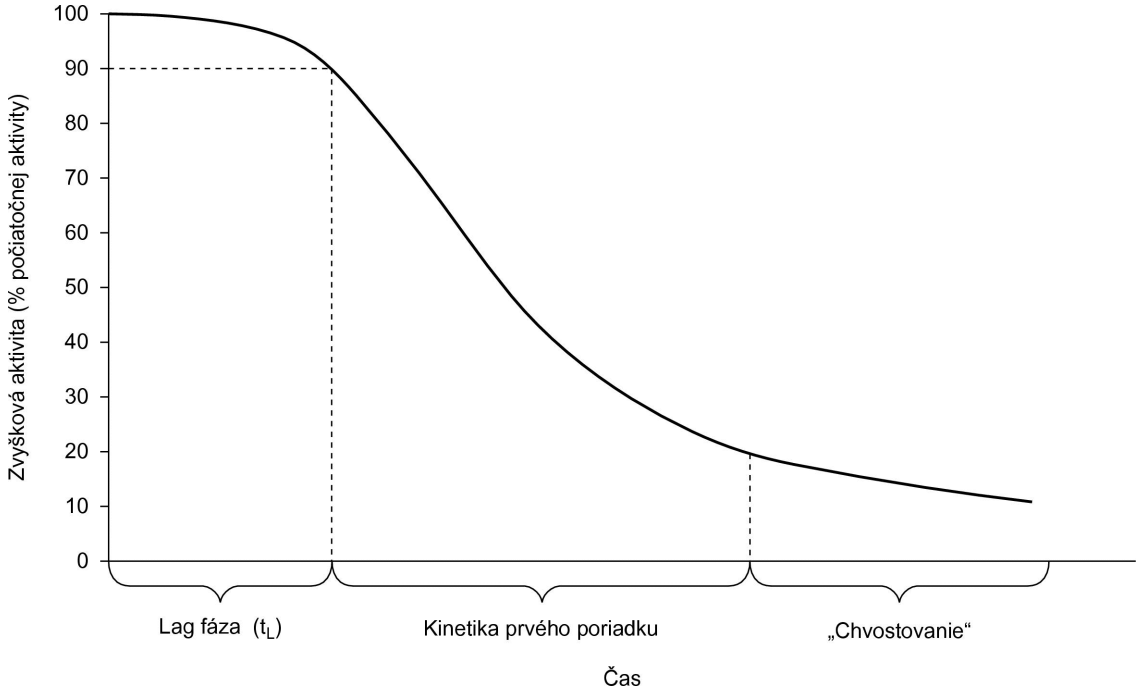
Priame stanovenie $^{14}CO_2$

Na priame stanovenie uvoľneného $^{14}CO_2$ sa na začiatku testu pripraví viac baniek, zužitkovanie testovacích baniek sa v každom bode stanovenia vykoná tak, že sa testovacie banky okyslia na pH 2 – 3 a $^{14}CO_2$ sa zhromaždí vo vnútornom (umiestnenom v každej testovacej banke na začiatku testu) alebo externom absorbéri. Ako absorbčné médium sa môže použiť buď alkalická zásada (napr. 1 N roztok NaOH alebo granule NaOH), etanolamín alebo komerčne dostupné absorbéry založené na etanolamíne. Na priame stanovenie $^{14}CO_2$ musia byť banky uzatvorené, napr. butylkaučukovou zátkou.

▼**M1**

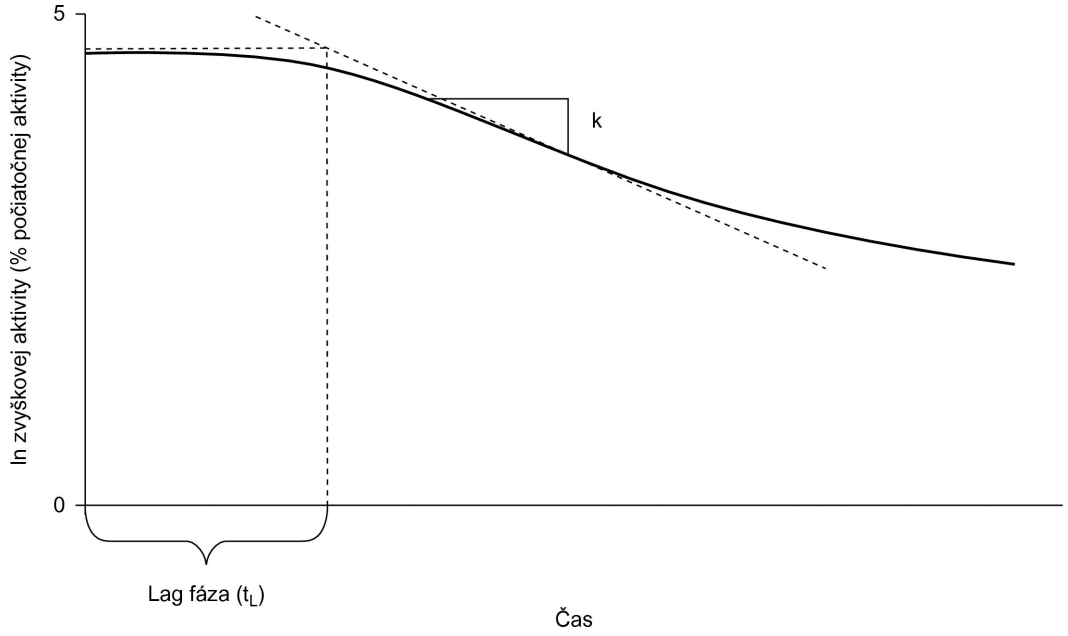
Obrázok 1a

Príklad aritmetického grafického zaznamenania údajov (zvyšková aktivita proti času)



Obrázok 1b

Vzor semilogaritmického grafického zaznamenania údajov (ln zvyškovej aktivity proti času)



▼M1

C.26. *LEMNA* SP. TEST INHIBÍCIE RASTU

1. METÓDA

Táto metóda je rovnocenná s OECD TG 221 (2006) (1). Orgány EÚ dospeli k širokému konsenzu, že pri silne zafarbených látkach sú testy s rodom *Lemna* vhodnou alternatívou k testu s riasami (2) (3).

1.1. ÚVOD

Táto testovacia metóda je určená na hodnotenie toxicity látok pre sladkovodné rastliny rodu *Lemna* (žaburinka). Je založená na existujúcich usmerneniach (4) (5) (6) (7) (8) (9), ale obsahuje modifikácie týchto metód zohľadňujúce najnovší výskum a konzultácie týkajúce sa množstva kľúčových aspektov. Navrhovaná metóda bola validovaná medzinárodným kruhovým testom (10).

Táto testovacia metóda opisuje testovanie toxicity pri použití *Lemna gibba* a *Lemna minor*, obidvoch druhov, ktoré sa študujú vo veľkej miere a podliehajú uvedeným normám. Taxonómia *Lemna* spp. je zložitá, komplikuje ju výskyt veľkého množstva fenotypov. Aj keď sa môže vyskytnúť genetická variabilita pri reakcii na toxické látky v prípade rodu *Lemna*, v súčasnosti neexistujú dostatočné údaje o tomto zdroji variability, aby sa mohol odporučiť konkrétny klon na použitie v tejto testovacej metóde. Je potrebné pripomenúť, že test sa nevykonáva axenicky, ale jednotlivé kroky počas postupu testu sa uskutočňujú v etapách, aby sa minimalizovala kontaminácia inými organizmami.

Uvádzajú sa informácie o testovaní pri obnove (semistatické a prietokové) a bez obnovy (statické) testovacieho roztoku. V závislosti od cieľov testu a od regulačných požiadaviek sa odporúča posúdiť semistatické a prietokové metódy, napr. pre látky, ktoré z roztoku rýchlo unikajú v dôsledku odparovania, fotodegradácie, precipitácie alebo biodegradácie. Ďalšie informácie sú uvedené v (11).

1.2. VYMEDZENIE POJMOV

Na účely tejto testovacej metódy sa používajú tieto pojmy a skratky:

Biomasa: je sušina živej hmoty nachádzajúcej sa v populácii. V tomto teste biomasu nahrádza napr. počet lístkov alebo plocha lístkov, ktoré sa bežne merajú, a používanie pojmu „biomasa“ sa teda vzťahuje aj na tieto náhradné kritériá.

Chloróza: je žltnutie tkaniva lístkov.

Klon: je organizmus alebo bunka, ktorá vznikla z jedného jedinca nepohlavným rozmnožovaním. Jedince z rovnakého klonu sú preto geneticky identické.

Kolónia: znamená zhluk navzájom spojených materských a dcérskych lístkov (obvykle 2 až 4). Niekedy sa uvádza ako rastlina.

▼M1

EC_x: je koncentrácia testovanej látky rozpustená v testovacom médiu, ktorá má za následok x % (napr. 50 %) zníženie rastu rodu *Lemna* v rámci stanoveného času expozície (je potrebné výslovne uviesť v prípade odchýlky od celkovej alebo obvyklej dĺžky testu). Na jednoznačné zaznamenanie hodnoty EC odvodenej z rýchlosti rastu alebo výťažku sa používa symbol „E_rC“ pre rýchlosť rastu a symbol „E_yC“ sa používa pre výťažok, po ktorom nasleduje použitá meraná premenná, napr. E_rC (počet lístkov).

Prietoková metóda: je test, v ktorom sa testovacie roztoky kontinuálne nahrádzajú.

Lístok: je individuálna/samostatná „lístkovitá“ štruktúra žaburinky. Je to najmenšia jednotka, t. j. jednotlivec schopný rozmnožovania.

Gibozita: znamená lístky, ktoré majú vypuklý alebo napuchnutý vzhľad.

Rast: je nárast meranej premennej, napr. počtu lístkov, sušiny, hmotnosti vo vlhkom stave alebo plochy lístkov, počas testu.

Rýchlosť rastu (**priemerná špecifická rýchlosť rastu**): je logaritmickým nárastom biomasy počas expozície testovanou látkou.

Najnižšia koncentrácia s pozorovateľnými účinkami (LOEC): je najnižšia testovaná koncentrácia, pri ktorej sa pozoruje, že látka má štatisticky významný účinok na zníženie rastu (pri $p < 0,05$) pri porovnaní s kontrolou v rámci daného času expozície. Škodlivý účinok všetkých testovaných koncentrácií nad LOEC však musí byť vždy rovnaký alebo väčší ako účinky pozorované pri LOEC. Ak nie sú splnené tieto dve podmienky, je potrebné poskytnúť úplné vysvetlenie, akým spôsobom sa zvolila LOEC (a teda aj NOEC).

Merané premenné: sú všetky typy premenných, ktoré sa merajú na vyjadrenie konečného bodu testu s použitím jedného alebo viacerých hodnôt reakcie. V tejto metóde počet lístkov, plocha lístkov, hmotnosť v čerstvom stave a sušina sú meranými premennými.

Monokultúra: je kultúra s jedným druhom rastliny.

Nekróza: je odumreté (t. j. biele alebo rozmočené) tkanivo lístkov.

Koncentrácia bez pozorovaného účinku (NOEC): je testovaná koncentrácia bezprostredne pod LOEC.

Fenotyp: je viditeľná charakteristika organizmu určená interakciou jeho génov s jeho prostredím.

Premenná hodnota reakcie: je premenná na odhad toxicity odvodená z akýchkoľvek stanovených premenných opisujúcich biomasu rôznymi metódami výpočtu. Pre túto metódu sú rýchlosti rastu a výťažok hodnoty reakcie odvodené z meraných premenných, ako počet lístkov, plocha lístkov, hmotnosť v čerstvom stave alebo sušina.

Semistatický (obnovovací) test: je test, v ktorom sa testovací roztok počas testu pravidelne nahrádza v konkrétnych intervaloch.

Statický test: je testovacia metóda bez obnovy testovacieho roztoku počas testu.

▼M1

Konečný bod testu: opisuje všeobecný faktor, ktorý sa zmení testovanou chemickou látkou v porovnaní s kontrolou ako cieľ testu. V tejto metóde je konečným bodom inhibícia rastu, ktorá môže byť vyjadrená rôznymi hodnotami reakcie, založenými na jednej alebo viacerých meraných premenných.

Testovacie médium: je kompletné syntetické kultivačné médium, v ktorom testované rastliny rastú v podmienkach expozície testovanou látkou. Testovaná látka sa pri normálnych podmienkach rozpustí v testovanom médiu.

Výťažok: je hodnota meranej premennej na vyjadrenie množstva biomasy na konci času expozície mínus meraná premenná na začiatku času expozície.

1.3. PRINCÍP TESTU

Umožní sa exponenciálny rast rastlinných kultúr rodu *Lemna* vo forme monokultúr v odlišných koncentráciách testovanej látky počas siedmich dní. Účelom testu je kvantifikovať účinky vo vzťahu k testovanej látke na vegetatívny rast počas tohto času založené na hodnotení zvolených meraných premenných. Počet lístkov je najdôležitejšou meranou premennou. Meria sa ešte aspoň jedna ďalšia meraná premenná (celková plocha lístkov, sušina alebo hmotnosť v čerstvom stave), lebo niektoré látky môžu oveľa viac ovplyvniť iné merané premenné ako počet lístkov. Na kvantifikovanie účinkov vzťahujúcich sa na testovanú látku sa rast v testovacích roztokoch porovnáva rastom v kontrolách a koncentrácia spôsobujúca špecifickú x % inhibíciu rastu (napr. 50 %) sa určí a vyjadrí ako EC_x (napr. EC_{50}).

Konečným bodom testu je inhibícia rastu vyjadrená ako logaritmický nárast meranej premennej (priemerná špecifická rýchlosť rastu) počas expozície. Z priemerných špecifických rýchlostí rastu zaznamenaných v sérii testovaných roztokov sa koncentrácia, ktorá spôsobuje špecifickú x % inhibíciu rýchlosti rastu (napr. 50 %), stanoví a vyjadrí ako E_rC_x (napr. E_rC_{50}).

Ďalšou hodnotou reakcie použitou v tejto testovacej metóde je výťažok, ktorý sa v niektorých krajinách vyžaduje na splnenie špecifických regulačných požiadaviek. Je definovaný ako merané premenné na konci času expozície mínus merané premenné na začiatku času expozície. Z výťažku zaznamenaného v sérii testovaných roztokov sa koncentrácia, ktorá spôsobuje špecifickú x % inhibíciu výťažku (napr. 50 %), vypočíta a vyjadrí ako E_yC_x (napr. E_yC_{50}).

Okrem toho možno štatisticky stanoviť najnižšiu koncentráciu s pozorovateľnými účinkami (LOEC) a koncentráciu bez pozorovaného účinku (NOEC).

1.4. INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

Musí byť k dispozícii analytická metóda s vhodnou citlivosťou na kvantifikáciu látky v testovacom médiu.

▼M1

Informácie o testovanej látke, ktoré môžu byť osožné pri stanovovaní testovacích podmienok, obsahujú štrukturálny vzorec, čistotu, rozpustnosť vo vode, stabilitu vo vode a svetle, pKa, K_{ow}, tlak pary a biologickú odbúrateľnosť. Rozpustnosť vo vode a tlak pary sa dajú použiť na výpočet Henryho konštanty, ktorá bude indikovať, či sú pravdepodobné značné úbytky testovanej látky. To pomôže pri indikácii, či je potrebné prijať konkrétne kroky na kontrolu takýchto úbytkov. Ak sú informácie o rozpustnosti a stabilite testovanej látky neurčité, odporúča sa, aby sa tieto informácie hodnotili za podmienok testu, t. j. rastové médium, teplota, režim osvetľovania používané v teste.

Ak je kontrola pH testovacieho média obzvlášť dôležitá, napr. pri testovaní kovov alebo látok, ktoré sú hydrolyticky nestabilné, odporúča sa pridať do rastového média tlmivý roztok (pozri prvý odsek v oddiele 1.7.4). Ďalšie informácie pre testované látky s fyzikálno-chemickými vlastnosťami, ktoré sťažujú ich testovanie, sú uvedené v (11).

1.5. REFERENČNÁ LÁTKA

Referenčná(-é) látka(-y), ako napr. 3,5-dichlórfenol, používaná(-é) v medzinárodnom kruhovom teste (10), sa môže(-u) testovať ako prostriedok kontroly postupu testu. Odporúča sa testovať referenčnú látku aspoň dvakrát do roka, alebo ak sa testovanie vykonáva menej často, súbežne so stanovením toxicity testovanej látky.

1.6. PLATNOSŤ TESTU

Tento test je platný, iba ak čas zdvojenia počtu lístkov v kontrole je menej ako 2,5 dní (60 h), čo zodpovedá približne sedemnásobnému zvýšeniu za sedem dní a priemernej špecifickej rýchlosti rastu 0,275 d^{-1}. Pri použití média a za podmienok testu uvedených v tejto testovacej metóde môže sa toto kritérium splniť, ak sa použije statický test (8). Rovnako sa predpokladá, že toto kritérium sa bude dať dosiahnuť aj za podmienok semistatického a prietokového testu. Výpočet času zdvojenia je uvedený v oddiele 2.1.

1.7. OPIS METÓDY

1.7.1. **Prístroje**

Všetky zariadenia, ktoré prichádzajú do styku s testovacím médiom, musia byť vyrobené zo skla alebo iného chemicky inertného materiálu. Sklené nádoby, ktoré sa používajú na kultiváciu a na testovanie, sa musia vyčistiť od chemických kontaminantov, ktoré by sa mohli rozpúšťať v testovacom médiu, a musia byť sterilné. Testovacie nádoby musia byť dostatočne široké, aby lístky rôznych kolónií v kontrolných nádobách mohli rásť bez prekrývania na konci testu. Neprekáža, ak sa korienky dotýkajú dna testovacích nádob, ale odporúča sa minimálna hĺbka 20 mm a minimálny objem 100 ml v každej testovacej nádobe. Výber testovacích nádob nie je rozhodujúci, pokiaľ sa tieto požiadavky dodržia. Vhodné sú všetky druhy sklených kadičiek, kryštalizačných misiek alebo sklených Petriho misiek vhodných rozmerov. Testovacie nádoby musia byť zakryté, aby sa minimalizovalo vyparovanie a náhodná kontaminácia, pričom sa musí umožniť potrebná výmena vzduchu. Vhodné testovacie nádoby, a predovšetkým veká nesmú spôsobovať tienenie alebo zmeny spektrálnych charakteristík svetla.

▼M1

Kultúry a testovacie nádoby sa nesmú uchovávať spoločne. To sa dá najlepšie dosiahnuť s použitím oddelených environmentálnych rastových komôr, inkubátorov alebo miestností. Osvetlenie a teplota sa musia byť nastavovateľné a udržiavané na konštantnej úrovni (pozri oddiel 1.7.8).

1.7.2. **Testované organizmy**

Organizmus používaný pre tento test je buď *Lemna gibba*, alebo *Lemna minor*. Krátka charakteristika druhov žaburinky, ktoré sa používajú na testovanie toxicity, je uvedená v dodatku 1. Rastlinný materiál možno získať zo zbierky kultúr, iného laboratória alebo z terénu. Ak je získaný z terénu, je potrebné minimálne osem týždňov pred použitím uchovávať rastliny v kultúre v rovnakom médiu, ako sa používa na testovanie. Miesta v teréne použité na zbieranie počiatočných kultúr musia byť bez zrejmých zdrojov kontaminácie. Ak sa získa z iného laboratória alebo zbierky kultúr, mali by sa podobne uchovávať minimálne tri týždne. Vždy je potrebné uviesť v správe zdroj rastlinného materiálu a druh a klon (ak je známy) použitý na testovanie.

Musia sa používať monokultúry, ktoré sú viditeľne bez kontaminácie inými organizmami, ako napr. riasy a prvoky. Zdravé rastliny *L. minor* sa skladajú z kolónií obsahujúcich dva až päť lístkov, pričom zdravé kolónie *L. gibba* môžu obsahovať až sedem lístkov.

Kvalita a uniformita rastlín, ktoré sa používajú na test, budú mať značný vplyv na výsledok testu, a preto by sa mali starostlivo vyberať. Musia sa použiť mladé, rýchlo rastúce rastliny bez viditeľných lézií alebo straty farby (chloróza). Kvalitné kultúry sa prejavujú vysokým výskytom kolónií, ktoré pozostávajú aspoň z dvoch lístkov. Veľký počet jediných lístkov značí environmentálny stres, napr. obmedzený prísun živín, a rastlinný materiál z takýchto kultúr sa nesmie použiť na testovanie.

1.7.3. **Kultivácia**

Na zníženie frekvencie uchovávania kultúr (napr. v čase, keď sa neplánujú žiadne testy s rodom *Lemna*) sa kultúry môžu uchovávať pri obmedzenom osvetlení a teplote (4 °C – 10 °C). Informácie o kultivovaní sú uvedené v dodatku 2. Zrejmé znaky kontaminácie riasami alebo inými organizmami budú vyžadovať povrchovú sterilizáciu čiastočnej vzorky lístkov rodu *Lemna*, ktorá sa potom prenesie do čerstvého média (pozri dodatok 2). V tomto prípade sa zvyšná kontaminovaná kultúra vyradí.

Aspoň sedem dní pred uskutočnením testu sa dostatočný počet kolónií prenesie sterilne do čerstvého sterilného média a kultivuje 7 – 10 dní za podmienok testu.

1.7.4. **Testovacie médium**

Odporúčajú sa rôzne médiá pre *Lemna minor* a *Lemna gibba*, ako sa uvádza nižšie. Je potrebné starostlivo posúdiť pridanie pH tlmivého roztoku do testovacieho roztoku [MOPS (kyselina 3-morfolinopropánsulfónová, č. CAS: 1132 – 61 – 2; č. EINECS: 214 – 478 – 5) v médiu pre *L. minor* a $NaHCO_3$ v médiu pre *L. gibba*], ak sa očakáva, že by mohli reagovať s testovanou látkou a ovplyvniť vyjadrenie jej toxicity. Steinbergovo médium (12) je tiež prijateľné, pokiaľ sú splnené kritériá platnosti.

▼M1

Odporúča sa modifikácia švédskej normy (SIS) rastového média pre *Lemna* na kultiváciu a testovanie *L. minor*. Zloženie tohto média je uvedené v dodatku 3.

Na kultiváciu a testovanie *L. gibba* sa odporúča rastové médium 20X – AAP, ako je uvedené v dodatku 3.

Steinbergovo médium, ako je uvedené v dodatku 3, je vhodné aj pre *L. minor*, ale sa môže použiť aj pre *L. gibba*, pokiaľ sú splnené kritériá platnosti.

1.7.5. **Testovacie roztoky**

Testovacie roztoky sa pripravujú obvykle zriedením zásobného roztoku. Zásobné roztoky testovacieho roztoku sa pripravujú obvykle rozpustením látky v rastovom médiu.

Najvyššia testovacia koncentrácia testovanej látky nesmie byť spravidla vyššia ako rozpustnosť látky vo vody za podmienok testu. Je potrebné však pripomenúť, že *Lemna* spp. plávajú na povrchu a môžu byť vystavené látkam, ktoré sa zhromažďujú na rozhraní voda-vzduch (napr. látky, ktoré sú vo vode zle rozpustné alebo hydrofóbne látky, alebo povrchovoaktívne látky). Za takýchto podmienok bude expozícia pochádzať z iného materiálu, ako sa nachádza v roztoku, a testovacie koncentrácie môžu v závislosti od vlastností testovanej látky byť vyššie ako rozpustnosť vo vode. Pre testované látky s nízkou rozpustnosťou vo vode môže byť potrebné pripraviť koncentrovaný zásobný roztok alebo disperziu látky s použitím organického rozpúšťadla alebo disperzantu, aby sa umožnilo pridanie príslušných množstiev testovanej látky do testovacieho média a napomohlo jej rozptýlenie a rozpustenie. Treba vyvinúť všetko úsilie na to, aby sa zabránilo použitiu takýchto materiálov. Nesmie sa vyskytovať žiadna fytotoxicita v dôsledku použitia pomocných rozpúšťadiel alebo disperzantov. Napríklad k bežne používaným rozpúšťadlám, ktoré nespôsobujú fytotoxicitu pri koncentráciách do 100 $\mu l \cdot l^{-1}$, patrí acetón a dimetylformamid. Ak sa používa rozpúšťadlo alebo disperzant, jeho konečná koncentrácia sa musí zaznamenať a udržiavať na minime ($\leq$ 100 $\mu \cdot l^{-1}$) a všetky ošetrené vzorky a kontroly musia obsahovať rovnakú koncentráciu rozpúšťadla alebo disperzantu. Ďalšie informácie o použití disperzantov sú uvedené v (11).

1.7.6. **Testované a kontrolné skupiny**

Predchádzajúce poznatky o toxicite testovanej látky pre rod *Lemna*, napr. z testov na zistenie rozmedzia, napomôžu pri voľbe vhodných testovaných koncentrácií. V konečnom teste toxicity musí byť aspoň päť testovaných koncentrácií zoradených v geometrických radoch. Prednostne nesmie byť rozdeľovací koeficient medzi testovanými koncentráciami vyšší ako 3,2, ale môže sa použiť vyššia hodnota, ak je krivka reakcie na koncentráciu plochá. Je potrebné uviesť zdôvodnenie, ak sa použije menej ako päť koncentrácií. Na každú testovanú koncentráciu sa musia použiť aspoň tri paralelky.

Pri stanovení rozsahu testovaných koncentrácií (v prípade testov na zistenie rozsahu a/alebo konečnom teste toxicity) je potrebné zvážiť toto:

▼M1

— Na stanovenie EC_x musia testované koncentrácie obklopovať hodnotu EC_x, aby sa zabezpečila primeraná úroveň spoľahlivosti. Napríklad ak sa odhaduje EC_{50}, najvyššia testovaná koncentrácia musí byť vyššia ako hodnota EC_{50}. Ak hodnota EC_{50} leží mimo rozsahu testovaných koncentrácií, asociované intervaly spoľahlivosti budú väčšie a môže sa stať, že sa vhodnosť modelu pre štatistické spracovanie nebude dať správne posúdiť.

— Ak je cieľom odhad LOEC/NOEC, najnižšia testovaná koncentrácia musí byť dostatočne nízka na to, aby rast nebol významne nižší ako v kontrole. A ďalej najvyššia testovaná koncentrácia musí byť dostatočne vysoká na to, aby bol rast významne nižší ako v kontrole. Ak to tak nie je, test sa bude musieť opakovať s použitím rôznych rozsahov koncentrácií (pokiaľ najvyššia koncentrácia nie je limitnou hodnotou rozpustnosti alebo maximálnou povolenou limitnou hodnotou koncentrácie, napr. 100 $mg \cdot l^{-1}$).

Každý test musí zahŕňať kontroly pozostávajúce z rovnakého živného média, počtu lístkov a kolónií, environmentálnych podmienok a postupov ako v prípade testovacích nádob, ale bez testovanej látky. Ak sa používa pomocné rozpúšťadlo alebo disperzant, musí sa zahrnúť ďalšia kontrola s rozpúšťadlom/disperzantom v rovnakej koncentrácii, ako sa nachádza v nádobách s testovanou látkou. Počet paralelných kontrolných nádob (a v prípade potreby nádob s rozpúšťadlom) musí byť minimálne rovnaký alebo v ideálnom prípade dvojnásobný ako počet nádob použitý pre každú testovanú koncentráciu.

Ak sa nevyžaduje stanovenie NOEC, môže sa test pozmeniť a zvýšiť počet koncentrácií a znížiť počet paraleliek na koncentráciu. Musia byť však aspoň tri paralelky kontroly.

1.7.7. **Expozícia**

Kolónie pozostávajúce z 2 až 4 viditeľných lístkov sa prenesú do kultúry inokula a náhodne sa rozdelia do testovacích nádob za sterilných podmienok. Každá testovacia nádoba musí obsahovať celkove 9 až 12 lístkov. Počet lístkov a kolónií musí byť rovnaký v každej testovacej nádobe. Zo skúseností pri použití tejto metódy a údajov kruhového testu vyplýva, že tri paralelky na jedno ošetrenie, pričom každá paralelka obsahuje na začiatku 9 až 12 lístkov, sú dostatočné na detekciu rozdielov v raste približne v rozmedzí 4 % až 7 % inhibície vypočítanej na základe rýchlosti rastu (10 % až 15 % vypočítanej podľa výťažku) medzi ošetreniami (10).

Je potrebné, aby sa testovacie nádoby v inkubátore umiestňovali náhodne, aby sa minimalizoval vplyv priestorových rozdielov v intenzite svetla alebo teplote. Takisto je potrebné blokové usporiadanie alebo náhodné premiestňovanie nádob pri uskutočňovaní pozorovaní (alebo častejšie premiestňovanie).

▼M1

Ak z predbežného testu stability vyplýva, že sa nedá zachovať koncentrácia testovanej látky (t. j. meraná koncentrácia poklesne pod 80 % meranej počiatočnej koncentrácie) počas trvania testu (7 dní), odporúča sa uskutočniť semistatický test. V tomto prípade sa kolónie musia exponovať čerstvo pripraveným testovacím a kontrolným roztokom aspoň dvakrát počas testu (napr. dni 3 a 5). Frekvencia expozície čerstvého média bude závisieť od stability testovanej látky; môže byť potrebná vyššia frekvencia na zachovanie približne konštantných koncentrácií veľmi nestabilných alebo prchavých látok. V niektorých prípadoch môže byť potrebné použiť prietokový postup (11) (13).

Spôsob expozície aplikáciou na listy (sprej) sa nenachádza v tejto testovacej metóde, namiesto toho pozri (14).

1.7.8. **Podmienky inkubácie**

Použije sa kontinuálne teplé alebo studené biele fluorescenčné osvetlenie na zabezpečenie zvolenej intenzity svetla medzi 85 – 135 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ pri meraní vo fotosynteticky aktívnom žiarení (400 – 700 nm) v bodoch v rovnakej vzdialenosti od zdroja svetla ako lístky rastliny rodu *Lemna* (rovnocenné 6 500 – 10 000 lux). Žiadna odlišnosť od zvolenej intenzity svetla nad plochou, kde sa uskutočňuje test, nesmú presiahnuť ± 15 %. Metóda detekcie svetla a merania, najmä typ senzora, ovplyvní meranú hodnotu. Guľové senzory (ktoré reagujú na svetlo zo všetkých uhlov nad a pod rovinou merania) a „kosínusové“ senzory (ktoré reagujú na svetlo zo všetkých uhlov nad rovinou merania) sa uprednostňujú pred jednosmernými senzormi a poskytnú presnejšie snímanie v prípade viacbodového svetelného zdroja takého typu, aký sa uvádza v tejto metóde.

Teplota v testovaných nádobách musí byť 24 °C ± 2 °C. pH kontrolného média sa nesmie zvýšiť počas testu o viac ako 1,5 jednotiek. Odchýlka o viac ako 1,5 jednotiek by však nemala spôsobiť neplatnosť testu, ak sa dokáže, že sú splnené kritériá platnosti. V určitých prípadoch je potrebné venovať dodatočnú pozornosť kolísaniu pH, ako napr. pri testovaní nestabilných látok alebo kovov. Ďalšie informácie sú uvedené v (11).

1.7.9. **Trvanie**

Test sa ukončí 7 dní po premiestnení rastlín do testovacích nádob.

1.7.10. **Merania a analytické stanovenia**

Na začiatku testu sa spočíta a zaznamená počet lístkov v testovacích nádobách, pričom je potrebné venovať pozornosť tomu, aby sa spočítali vystupujúce, zreteľne viditeľné lístky. Počet lístkov, ktoré majú normálny alebo abnormálny vzhľad, je potrebné stanoviť na začiatku testu, minimálne každé 3 dni počas expozície (t. j. aspoň 2-krát počas 7 dní) a po ukončení testu. Je potrebné si všimnúť zmeny vo vývoji rastliny, napr. vo veľkosti lístkov, vzhľade, známky nekrózy, chlorózy a gibozity, rozpad kolónií alebo stratu schopnosti plávať na hladine a v dĺžke korienkov a vzhľade. Je potrebné si všimnúť aj významné znaky testovacieho média (napr. prítomnosť nerozpusteného materiálu, rast rias v testovacej nádobe).

▼M1

Okrem stanovení počtu lístkov počas testu sa posudzujú aj účinky testovanej látky na jednu (alebo viac) z týchto meraných premenných:

i) celková plocha lístkov;

ii) sušina;

iii) hmotnosť v čerstvom stave.

Celková plocha lístkov je výhodná, lebo sa dá stanoviť pre každý test a kontrolnú nádobu na začiatku, počas a na konci testu. Sušinu alebo hmotnosť v čerstvom stave je potrebné stanoviť na začiatku testu zo vzorky kultúry inokula, ktorá predstavuje kultúru použitú na začiatku testu a na konci testu, s rastlinným materiálom z každého testu a kontrolnej nádoby. Ak sa plocha lístkov nemeria, uprednostňuje sa sušina pred hmotnosťou v čerstvom stave.

Celková plocha lístkov, sušina a hmotnosť v čerstvom stave sa môže stanoviť takto:

i) Celková plocha lístkov: Celková plocha lístkov všetkých kolónií sa môže stanoviť analýzou obrazu. Siluetu testovacej nádoby a rastlín možno zachytiť prostredníctvom videokamery (t. j. umiestnením nádoby na svetelný box) a výsledný obraz sa digitalizuje. Kalibráciou plochých tvarov známej plochy sa potom môže stanoviť celková plocha lístkov v testovacej nádobe. Je potrebné venovať pozornosť tomu, aby sa vylúčila interferencia spôsobená okrajom testovacej nádoby. Alternatívnym, ale prácnejším prístupom je urobiť fotokópiu testovacej nádoby a rastlín, vystrihnúť výslednú siluetu kolónií a stanoviť ich plochu s použitím analyzátora plochy lístkov alebo milimetrového papiera. Môžu byť vhodné aj iné techniky (napr. pomer hmotnosti papiera medzi plochou siluety kolónii a jednotkou plochy).

ii) Sušina: Všetky kolónie sa zozbierajú z každej testovacej nádoby a opláchnu destilovanou alebo deionizovanou vodou. Osušia sa, aby sa odstránila nadbytočná voda a potom sa sušia pri 60 °C do konštantnej hmotnosti. Musia obsahovať všetky úlomky korienkov. Sušina sa musí vyjadriť s presnosťou minimálne 0,1 mg.

iii) Hmotnosť v čerstvom stave: Všetky kolónie sa prenesú do predvážených polystyrénových (alebo iný inertný materiál) skúmaviek s malými (1 mm) otvormi v zaoblených dnách. Skúmavky sa potom 10 minút centrifugujú pri 3 000 rpm pri teplote miestnosti. Skúmavky obsahujúce už vysušené kolónie sa opätovne prevážia a hmotnosť v čerstvom stave sa vypočíta odpočítaním hmotnosti prázdnej skúmavky.

1.7.10.1. *Frekvencia meraní a analytické stanovenia*

Ak sa použije statický test, na začiatku a na konci testu sa musí zmerať pH každej ošetrenej vzorky. Ak sa použije semistatický test, pH sa musí zmerať v každej dávke „čerstvého“ testovacieho roztoku pred každým obnovením a aj v zodpovedajúcich „spotrebovaných“ roztokoch.

▼M1

Intenzita svetla sa musí merať v rastovej komore, inkubátore alebo miestnosti v bodoch v rovnakej vzdialenosti od zdroja svetla ako lístky *Lemna*. Merania sa musia uskutočniť minimálne jedenkrát počas testu. Teplota média v náhradnej nádobe udržiavanej v rovnakých podmienkach v rastovej komore, inkubátore alebo miestnosti sa musí zaznamenať minimálne jedenkrát za deň.

Počas testu sa v príslušných intervaloch stanovia koncentrácie testovanej látky. V statických testoch je minimálne potrebné stanoviť koncentrácie na začiatku a na konci testu.

V semistatických testoch, kde sa očakáva, že koncentrácie testovanej látky nebudú v rozmedzí ± 20 % nominálnej koncentrácie, je potrebné analyzovať všetky čerstvo pripravené testovacie roztoky a rovnaké roztoky pri každom obnovení (pozri tretí odsek v oddiele 1.7.7). V prípade tých testov, kde však nameraná počiatočná koncentrácia testovanej látky nie je v rozmedzí ± 20 % nominálnej hodnoty, ale kde sa dajú poskytnúť dostačujúce dôkazy na preukázanie, že počiatočné koncentrácie sú reprodukovateľné a stabilné (t. j. v rozmedzí 80 % – 20 % počiatočnej koncentrácie), sa môžu chemické stanovenia vykonať iba s najvyššími a najnižšími testovanými koncentráciami. Vo všetkých prípadoch je potrebné stanoviť koncentrácie testovanej látky pred obnovením iba v jednej paralelnej nádobe na každú testovanú koncentráciu (alebo obsahy nádob rozdelených do paraleliek).

Ak sa použije prietokový test, je vhodný podobný systém odberu vzoriek, ako je uvedený pre semistatické testy, vrátane analýzy na začiatku, v polovici a na konci testu, ale meranie „spotrebovaných“ roztokov v tomto prípade nie je vhodné. Pri tomto type sa musí prietoková rýchlosť riedidla a testovaná látka alebo zásobný roztok testovanej látky denne kontrolovať.

Ak je dokázané, že koncentrácia látky, ktorá sa testuje, je počas testu dostatočnej miere udržiavaná v rozmedzí ± 20 % nominálnej hodnoty alebo nameranej počiatočnej koncentrácie, analýza výsledkov sa môže zakladať na nominálnych hodnotách alebo nameraných počiatočných hodnotách. Ak je odchýlka od nominálnej alebo nameranej počiatočnej koncentrácie väčšia ako ± 20 %, analýza výsledkov sa musí zakladať na geometrickej strednej koncentrácii počas expozície alebo modeloch opisujúcich pokles koncentrácie testovanej látky (11).

1.7.11. **Limitný test**

Za niektorých okolností, napr. ak z predbežného testu vyplýva, že testovaná látka nemá žiadne toxické účinky pri koncentráciách do 100 $mg \cdot l^{-1}$ alebo do jej limitu rozpustnosti v testovacom médiu (podľa toho, ktorá hodnota je nižšia), môže sa uskutočniť limitný test umožňujúci porovnanie reakcií v kontrolnej skupine a jednej ošetrenej skupine (100 $mg \cdot l^{-1}$ alebo koncentrácia rovnaká ako limit rozpustnosti). Dôrazne sa odporúča, aby sa toto zakladalo na analýze expozičnej koncentrácie. Na limitný test platia všetky už uvedené testovacie podmienky a kritériá validity s výnimkou, že musí byť aspoň šesť ošetrených paraleliek. Rast v kontrolnej a ošetrenej skupine sa môže analyzovať s použitím štatistického testu na porovnanie prostriedkov, napr. Študentov t-test.

▼M1

2. **ÚDAJE A SPRÁVY**

2.1. ČAS ZDVOJENIA

Na stanovenie času zdvojenia (T_d) počtu lístkov a pri dodržaní tohto kritéria platnosti podľa štúdie (oddiel 1.6) sa použije tento vzorec s údajmi, ktoré sa získali z kontrolných nádob:

$$T_d = \ln 2/\mu$$

kde μ je priemerná špecifická rýchlosť rastu stanovená a opísaná v prvom a druhom odseku oddielu 2.2.1.

2.2. HODNOTY REAKCIE

Cieľom testu je stanoviť účinky testovanej látky na vegetatívny rast rastlín rodu *Lemna*. Táto testovacia metóda opisuje dve premenné hodnoty reakcie, keďže členské krajiny majú rozdielne preferencie a regulačné požiadavky. Aby boli výsledky testu prijateľné vo všetkých členských krajinách, účinky sa musia vyhodnotiť s použitím oboch premenných hodnôt reakcie a) a b), ktoré sú uvedené nižšie.

a) Priemerná špecifická rýchlosť rastu: táto premenná hodnota reakcie sa vypočíta na základe zmien logaritmu počtu lístkov a okrem toho na základe zmien logaritmu iného parametra merania (celková plocha lístkov, sušina alebo hmotnosť v čerstvom stave) v kontrolách a v každej ošetrenej skupine až do ukončenia testu. Niekedy sa uvádza ako relatívna rýchlosť rastu (15).

b) Výťažok: táto premenná hodnota reakcie sa vypočíta na základe zmien počtu lístkov a okrem toho na základe zmien iného parametra merania (celková plocha lístkov, sušina alebo hmotnosť v čerstvom stave) v kontrolách a v každej ošetrenej skupine až do ukončenia testu.

Je potrebné pripomenúť, že hodnoty toxicity vypočítané s použitím týchto dvoch premenných hodnôt reakcie nie sú porovnateľné a tento rozdiel sa musí zohľadniť pri použití výsledkov testu. EC_x hodnoty založené na priemernej špecifickej rýchlosti rastu (E_rC_x) budú obvykle vyššie ako výsledky založené na výťažku (E_yC_x) pri dodržaní testovacích podmienok tejto testovacej metódy kvôli matematickému základu príslušných metód. Neznamená to rozdiel v citlivosti medzi oboma premennými hodnotami reakcie, ale jednoducho to znamená, že hodnoty sa odlišujú matematicky. Pojem priemerná špecifická rýchlosť rastu sa zakladá na všeobecnom exponenciálnom modele rastu rias v nelimitovaných kultúrach, kde sa toxicita stanovuje na základe účinkov na rýchlosť rastu, bez závislosti od absolútnej úrovne špecifickej rýchlosti rastu kontroly, od klesania krivky reakcie na koncentráciu alebo od dĺžky testu. Naopak je to v prípade výsledkov založených na výťažku ako premennej hodnote reakcie, ktoré sú závislé od všetkých týchto ďalších premenných. E_yC_x je závislé od špecifickej rýchlosti rastu druhov žaburiniek, ktoré sa používajú v každom teste, a od maximálnej špecifickej rýchlosti rastu, ktorá sa môže meniť medzi druhmi a dokonca medzi rozdielnymi klonmi. Táto premenná hodnota reakcie sa nesmie použiť na porovnanie citlivosti na toxické látky medzi druhmi žaburinky alebo dokonca odlišnými klonmi. Zatiaľ čo sa z vedeckého hľadiska uprednostňuje použitie priemernej špecifickej rýchlosti rastu, na odhady toxicity, aby sa vyhovelo súčasným regulačným požiadavkám v niektorých krajinách, do tejto testovacej metódy sa zahrnulo aj stanovenie toxicity založené na výťažku.

▼M1

Odhady toxicity sa musia zakladať na počte lístkov a na jednej ďalšej meranej premennej (celková plocha lístkov, suchá hmotnosť alebo čerstvá hmotnosť), pretože niektoré látky môžu ovplyvniť iné merané premenné oveľa viac ako počet lístkov. Tento účinok by sa nemal stanovovať iba na základe počítania počtu lístkov.

Počet lístkov, ako aj každá iná zaznamenaná meraná premenná, t. j celková plocha lístkov, sušina alebo hmotnosť v čerstvom stave, sa zapíše do tabuľky spolu s koncentráciami testovanej látky pri každom meraní. Následná analýza údajov, napr. na odhad LOEC, NOEC alebo EC_x, sa musí zakladať na hodnotách pre jednotlivé paralelné vzorky a nie na vypočítaných stredných hodnotách pre každú ošetrenú skupinu.

2.2.1. **Priemerná špecifická rýchlosť rastu**

Priemerná špecifická rýchlosť rastu za konkrétny čas sa vypočíta ako logaritmus nárastu premenných rastu – počtu lístkov a jednej ďalšej meranej premennej (celková plocha lístkov, sušina alebo hmotnosť v čerstvom stave) – s použitím uvedeného vzorca pre každú paralelnú vzorku kontroly a ošetrených vzoriek:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

kde:

— μ_{i-j}: priemerná špecifická rýchlosť rastu od času i do j

— N_i: meraná premenná v testovacej alebo kontrolnej nádobe v čase i

— N_j: meraná premenná v testovacej alebo kontrolnej nádobe v čase j

— t: čas od i do j.

Pre každú ošetrenú a kontrolnú skupinu vypočítajte strednú hodnotu pre rýchlosť rastu spolu s odhadmi variancie.

Priemerná špecifická rýchlosť rastu sa vypočíta pre celý čas testu (čas „i“ v uvedenom vzorci je začiatok testu a čas „j“ je koniec testu). Pre každú testovanú koncentráciu a kontrolu vypočítajte strednú hodnotu špecifickej rýchlosti rastu spolu s odhadmi variancie. Okrem toho sa môže stanoviť rýchlosť rastu po častiach, aby sa vyhodnotili účinky testovanej látky, ktoré sa vyskytnú počas expozície (napr. skontrolovaním logaritmicky transformovaných rastových kriviek). Značné rozdiely medzi rýchlosťou rastu po častiach a priemernou rýchlosťou rastu indikujú odchýlku od konštantného exponenciálneho rastu, a to, že je zaručené dôkladné preskúmanie rastových kriviek. V tomto prípade by bolo konzervatívnym prístupom porovnávanie špecifických rýchlostí rastu ošetrených kultúr počas času maximálnej inhibície so špecifickými rýchlosťami rastu kontrol počas rovnakého času.

▼M1

Percento inhibície rýchlosti rastu (I_r) sa môže potom vypočítať pre každú testovanú koncentráciu (ošetrenú skupinu) podľa tohto vzorca:

$$\% I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

kde:

— % I_r: percento inhibície priemernej špecifickej rýchlosti rastu

— μ_C: stredná hodnota pre μ v kontrole

— μ_T: stredná hodnota pre μ v ošetrenej skupine.

2.2.2. **Výťažok**

Účinky na výťažok sa stanovia na základe dvoch meraných premenných, počtu lístkov a jednej ďalšej meranej premennej (celkového počtu lístkov, suchej hmotnosti alebo čerstvej hmotnosti) nachádzajúcej sa v každej testovacej nádobe na začiatku a na konci testu. Pre sušinu alebo hmotnosť v čerstvom stave sa počiatočné množstvo biomasy stanoví na základe vzorky lístkov odobratých z rovnakej dávky použitej na inokuláciu testovacích nádob (pozri druhý odsek v oddiele 1.7.3). Pre každú testovanú koncentráciu a kontrolu vypočítajte strednú hodnotu výťažku spolu s odhadmi variancie. Stredné percento inhibície výťažku (%I_y) sa môže vypočítať pre každú ošetrenú paralelnú vzorku takto:

$$\% I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C} \times 100$$

kde:

— % I_y: percento zníženia výťažku

— b_C: konečné množstvo biomasy mínus počiatočné množstvo biomasy pre kontrolnú skupinu

— b_T: konečné množstvo biomasy mínus počiatočné množstvo biomasy v ošetrenej skupine.

2.2.3. **Zostrojenie kriviek reakcie na koncentráciu**

Krivky reakcie na koncentráciu vzťahujúce sa na stredné percento inhibície hodnoty reakcie (I_r, alebo I_y vypočítané, ako je uvedené v poslednom odseku oddielu 2.2.1 alebo v oddiele 2.2.2), a logaritmus koncentrácie testovanej látky sa graficky zaznamenajú.

2.2.4. **Odhad EC_x**

Odhady EC_x (napr. EC_{50}) sa musia zakladať na priemernej rýchlosti rastu (E_rC_x) a aj na výťažku (E_yC_x), z ktorých sa každý musí zasa zakladať na počte lístkov a jednej ďalšej meranej premennej (celkový počet lístkov, sušina alebo hmotnosť v čerstvom stave). Je to preto, že existujú testované látky, ktoré rozdielne vplývajú na počet lístkov, a iné merané premenné. Požadovanými parametrami toxicity sú preto štyri hodnoty EC_x pre každú vypočítanú úroveň inhibície x: E_rC_x (počet lístkov), E_rC_x (celková plocha lístkov, sušina alebo hmotnosť v čerstvom stave), E_yC_x (počet lístkov) a E_yC_x (celková plocha lístkov, sušina alebo hmotnosť v čerstvom stave).

▼M1

2.3. ŠTATISTICKÉ POSTUPY

Cieľom je získať kvantitatívny vzťah medzi koncentráciou a reakciou regresnou analýzou. Možno použiť váženú lineárnu regresiu po uskutočnení linearizovanej transformácie reakčných údajov – napríklad na probitové alebo logitové alebo Weibullove jednotky (16), alebo sa uprednostňujú techniky nelineárnej regresie, ktorými sa lepšie spracujú nepresnosti údajov, ktorým sa nedá zabrániť, a odchýlky od hladkých rozdelení. Priblížením buď k nulovej, alebo úplnej inhibícii sa takéto nepresnosti môžu transformáciou zväčšiť a ovplyvniť analýzu (16). Je potrebné pripomenúť, že štandardné metódy analýzy s použitím probitových, logitových alebo Weibullových transformácií sa plánujú na použitie na kvantálne (napr. mortalita alebo prežitie) údaje a musia sa modifikovať, aby sa prispôsobili údajom o rýchlosti rastu alebo biomasy. Osobitné postupy na stanovenie hodnôt EC_x zo spojitých údajov možno nájsť v (17) (18) a (19).

Pre každú hodnotu reakcie, ktorá sa má analyzovať, použite vzťah medzi koncentráciou a reakciou na výpočet bodových odhadov hodnôt EC_x. Ak je to možné, je potrebné stanoviť 95 % hranice spoľahlivosti pre každý odhad. Vhodnosť reakčných údajov pre regresný model je potrebné vyhodnotiť buď graficky, alebo štatisticky. Regresná analýza sa musí uskutočniť s použitím jednotlivých reakcií paralelných vzoriek, nie stredných hodnôt ošetrenej skupiny.

Odhady EC_{50} a hranice spoľahlivosti sa môžu získať aj s použitím lineárnej interpolácie bootstrappingom (20), ak dostupné regresné modely/metódy sú pre údaje nevhodné.

Na odhad LOEC aj NOEC je potrebné porovnať stredné hodnoty ošetrenej skupiny s použitím techník pre analýzu variancie (ANOVA). Stredná hodnota pre každú koncentráciu sa musí potom porovnať s kontrolnou strednou hodnotou s použitím príslušného viacnásobného porovnania alebo testovacej metódy trendu. Môže sa použiť Dunnettov alebo Williamsov test (21) (22) (23) (24). Je potrebné stanoviť, či je dodržaný ANOVA predpoklad homogenity variancie. Toto stanovenie sa môže uskutočniť graficky alebo oficiálnym testom (25). Vhodný je Levenov alebo Bartlettov test. Nesplnenie predpokladu homogenity variancie sa môže niekedy korigovať logaritmickou transformáciou údajov. Ak je heterogenita variancie extrémna a nedá sa korigovať transformáciou, je potrebné posúdiť analýzu metódami, ako sú napr. „step-down Jonkheere“ testy trendu. Ďalšie informácie o stanovení NOEC možno nájsť v (19).

Najnovší vývoj vo vede vedie k odporúčaniu, aby sa upustilo od koncepcie NOEC a aby sa nahradila regresiou založenou na bodovom odhade EC_x. Príslušná hodnota pre x nebola stanovená pre tento test na rastlinách rodu *Lemna*. Rozsah 10 % až 20 % sa však zdá byť vhodný (v závislosti od zvolenej hodnoty reakcie) a prednostne sa musí zaznamenať EC_{10} a EC_{20}.

3. **SPRÁVA**

3.1. SPRÁVA Z TESTU

Správa z testu musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná látka:

— fyzikálny charakter a príslušné fyzikálno-chemické vlastnosti vrátane limitu rozpustnosti vo vode,

▼M1

— chemické identifikačné údaje (napr. číslo CAS) vrátane čistoty.

Testované druhy:

— vedecký názov, klon (ak je známy) a zdroj.

Testovacie podmienky:

— použitý postup testovania (statický, semistatický alebo prietokový),

— dátum začiatku testu a jeho dĺžka,

— testovacie médium,

— opis priebehu experimentu: testovacie nádoby a veká, objemy roztokov, počet kolónií a lístkov na testovaciu nádobu na začiatku testu,

— testované koncentrácie (nominálne a merané podľa potreby) a počet paralelných vzoriek na koncentráciu,

— metódy prípravy zásobných roztokov vrátane všetkých použitých rozpúšťadiel alebo disperzantov,

— teplota počas testu,

— zdroj svetla, intenzita a homogenita,

— hodnoty pH testovacieho a kontrolného média,

— koncentrácie testovaných látok a metóda analýzy s príslušným posúdením kvality údajov (validačné štúdie, štandardné odchýlky alebo hranice spoľahlivosti analýzy),

— metódy stanovenia počtu lístkov a iné merané premenné, napr. sušina, hmotnosť v čerstvom stave alebo počet lístkov,

— všetky odchýlky od tejto testovacej metódy.

Výsledky:

— nespracované údaje: počet lístkov a iné merané premenné v každej testovacej a kontrolnej nádobe pri každom pozorovaní a analýze,

— stredné hodnoty a štandardné odchýlky pre každú meranú premennú,

— rastové krivky pre každú koncentráciu (odporúčané s logaritmicky transformovanou meranou premennou, pozri druhý odsek v oddiele 2.2.1),

— čas zdvojenia/rýchlosť rastu v kontrole založené na počte lístkov,

— vypočítané hodnoty reakcie pre každú ošetrenú paralelnú vzorku so strednými hodnotami a variančným koeficientom pre paralelky,

— grafické znázornenie vzťahu koncentrácie/účinku,

— odhady toxických konečných bodov pre hodnoty reakcie, napr. EC_{50}, EC_{10}, EC_{20}, a príslušné intervaly spoľahlivosti. Ak sa vypočítava, LOEC a NOEC a štatistické metódy použité na ich stanovenie,

▼M1

— ak sa používa ANOVA, veľkosť účinku, ktorý sa stanovil (napr. najmenej významný rozdiel),

— každá stimulácia rastu zistená v každom ošetrení,

— všetky viditeľné znaky fytotoxicity, ako aj pozorovania testovacích roztokov,

— diskusia k výsledkom vrátane každého vplyvu na záver z testu vyplývajúceho z odchýlok od tejto testovacej metódy.

4. **POUŽITÁ LITERATÚRA**

(1) OECD TG 221 (2006) Lemna Sp. Growth Inhibition Test.

(2) The use of Lemna studies for coloured substances is detailed in Section 13.5.3 of the EU Manual of Decisions dated July 2006, at http://ecb.jrc.ec.europa.eu/new-chemicals.

(3) Guidance on information requirements and chemical safety assessment – Chapter R.7b: Endpoint specific guidance; Table 7.8.3 Summary of difficult substance testing issues, dostupné na adrese:

http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/-information_requirements_en.htm?time=1234958685#

(4) ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415 – 91 (Reapproved 1998). pp. 733 – 742. In, Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05 Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, ASTM, West Conshohocken, PA.

(5) USEPA – United States Environmental Protection Agency. (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using Lemna spp., „Public draft". EPA 712-C-96 – 156. 8 pp.

(6) AFNOR – Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90 – 337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 pp.

(7) SSI – Swedish Standards Institute. (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (v švédčine).

(8) Environment Canada. (1999). Biological Test Method: Test for Measuring the Inhibition of Growth Using the Freshwater Macrophyte, *Lemna minor*. EPS 1/RM/37 – 120 pp.

(9) Environment Canada. (1993) Proposed Guidelines for Registration of Chemical Pesticides: Non-Target Plant Testing and Evaluation. Canadian Wildlife Service, Technical Report Series No. 145.

(10) Sims I., Whitehouse P., and Lacey R. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency.

(11) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

(12) ISO DIS 20079. Water Quality – Determination of the Toxic Effect of Water Constituents and Waste Water to Duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed Growth Inhibition Test.

▼**M1**

(13) Walbridge C. T. (1977). A flow-through testing procedure with duckweed (*Lemna minor L.*). Environmental Research Laboratory – Duluth, Minnesota 55804. US EPA Report No. EPA-600/3 – 77 108. September 1977.

(14) Lockhart W. L., Billeck B. N. and Baron C. L. (1989). Bioassays with a floating plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. Hydrobiologia, 118/119, 353 – 359.

(15) Huebert, D.B. and Shay J.M. (1993) Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environmental Toxicology and Chemistry, 12, 481 – 483.

(16) Christensen, E.R., Nyholm, N. (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. Env. Sci. Technol. 19, 713 – 718.

(17) Nyholm, N. Sørensen, P.S., Kusk, K.O. and Christensen, E.R. (1992): Statistical treatment of data from microbial toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem. 11, 157 – 167.

(18) Bruce R.D. and Versteeg D.J. (1992) A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry, 11, 1485 – 1494.

(19) OECD. (2004). Guidance Document on Statistical Analysis of Ecotoxicity Data.

(20) Norberg-King T.J. (1988) An interpolation estimate for chronic toxicity: The ICp approach. National Effluent Toxicity Assessment Center Technical Report 05 – 88. USEPA, Duluth, MN.

(21) Dunnett, C.W. (1955) A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statist. Assoc., 50, 1096 – 1121.

(22) Dunnett, C.W. (1964) New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20, 482 – 491.

(23) Williams, D.A. (1971) A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103 – 117.

(24) Williams, D.A. (1972) The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510 – 531.

(25) Brain P. and Cousens R. (1989). An equation to describe dose-responses where there is stimulation of growth at low doses. Weed Research, 29, 93 – 96.

▼M1

Dodatok 1

Opis *Lemna* spp.

Vodná rastlina bežne nazývaná žaburinka, *Lemna* spp., patrí do čeľade *Lemnaceae*, ktorá má množstvo druhov rozšírených po celom svete v štyroch rodoch. Ich odlišný vzhľad a taxonómia sú dôkladne opísané (1) (2). *Lemna gibba* a *L. minor* sú druhy zastúpené v miernych pásmach a bežne sa používajú na testy toxicity. Obidva druhy majú plávajúcu alebo ponorenú byľ v tvare disku (lístok) a veľmi tenký koreň vychádzajúci z centra spodnej plochy každého lístka. *Lemna* spp. zriedkavo vytvárajú kvety a rastliny sa rozmnožujú vegetatívne vytváraním nových lístkov (3). V porovnaní so staršími rastlinami bývajú bledšie, majú kratšie korene a skladajú sa z dvoch až troch lístkov rôznych veľkostí. Malá veľkosť rastliny *Lemna*, jej jednoduchá štruktúra, nepohlavné rozmnožovanie a krátky čas vývoja umožňujú, že rastliny tohto rodu sú veľmi vhodné na laboratórne testovanie (4) (5).

Vzhľadom na pravdepodobné odchýlky medzi druhmi sú platné iba porovnania citlivosti v rámci jedného druhu.

Príklady druhov *Lemna*, ktoré sa používajú na testovanie: Odkazy týkajúce sa druhov

Lemna aequinoctialis: Eklund, B. (1996). The use of the red alga *Ceramium strictum* and the duckweed *Lemna aequinoctialis* in aquatic ecotoxicological bioassays. Licentiate in Philosophy Thesis 1996:2. Dep. of Systems Ecology, Stockholm University.

Lemna major: Clark, N. A. (1925). The rate of reproduction of *Lemna major* as a function of intensity and duration of light. J. phys. Chem., 29: 935 – 941.

Lemna minor: United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft“. EPA 712-C-96 – 156. 8 pp.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90 – 337: Détermination de l’inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 pp.

Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15 pp. (v švédčine).

Lemna gibba: ASTM International. (2003). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Test With *Lemna gibba* G3. E 1415 – 91 (Reapproved 1998). pp. 733 – 742.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1996). OPPTS 850.4400 Aquatic Plant Toxicity Test Using *Lemna* spp., „Public draft“. EPA 712-C-96 – 156. 8 pp.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959 – 1969.

Lemna perpusilla: Clark, J. R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*). Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87 – 96.

Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481 – 483.

▼M1

Lemna valdiviana: Hutchinson, T.C., Czyrska, H. (1975). Heavy metal toxicity and synergism to floating aquatic weeds. Verh.-Int. Ver. Limnol., 19:2102 – 2111.

Zdroje druhov *Lemna*

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
Department of Botany, University of Toronto
Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2
Tel. +1 4169783641
Fax +1 4169785878
e-mail: jacreman@botany.utoronto.ca
http://www.botany.utoronto.ca/utcc

North Carolina State University
Forestry Dept
Duckweed Culture Collection
Campus Box 8002
Raleigh, NC 27695 – 8002
United States
Tel. 1 9195157572
astomp@unity.ncsu.edu

Institute of Applied Environmental Research (ITM) Stockholm University
SE-106 91 STOCKHOLM
SWEDEN
Tel. +46 86747240
Fax +46 86747636

Federal Environmental Agency (UBA)
FG III 3.4
Schichauweg 58
12307 Berlin
GERMANY
e-mail: lemna@uba.de
http://www.umweltbundesamt.de/contact.htm

Použitá literatúra

(1) Hillman, W.S. (1961). The *Lemnaceae* or duckweeds: A review of the descriptive and experimental literature. The Botanical Review, 27:221 – 287.

(2) Landolt, E. (1986). Biosystematic investigations in the family of duckweed (*Lemnaceae*). Vol. 2. Geobotanischen Inst. ETH, Stiftung Rubel, Zürich, Switzerland.

(3) Björndahl, G. (1982). Growth performance, nutrient uptake and human utilization of duckweeds (*Lemnaceae* family). ISBN 82 – 991150 – 0 – 0. The Agricultural Research Council of Norway, University of Oslo.

(4) Wang, W. (1986). Toxicity tests of aquatic pollutants by using common duckweed. Environmental Pollution, Ser B, 11:1 – 14.

(5) Wang, W. (1990). Literature review on duckweed toxicity testing. Environmental Research, 52:7 – 22.

▼M1

Dodatok 2

Uchovávanie zásobnej kultúry

Zásobné kultúry sa môžu dlhší čas uchovávať pri nízkych teplotách (4 °C – 10 °C) bez toho, aby ich bolo potrebné opätovne pripraviť. Rastové médium pre rastliny rodu *Lemna* môže byť rovnaké, ako sa používa na testovanie, ale pre zásobné kultúry sa môžu použiť iné médiá bohaté na živiny.

Pravidelne sa pomocou sterilných nástrojov premiestni množstvo mladých svetlozelených rastlín do nových kultivačných nádob obsahujúcich čerstvé médium. Pri chladnejšej teplote navrhnutej v tomto materiáli sa môže čiastočná kultivácia vykonávať v intervaloch až tri mesiace.

Musia sa používať chemicky čisté (umyté v kyseline) a sterilné sklenené kultivačné nádoby a sterilné postupy. V prípade kontaminácie zásobnej kultúry, napr. riasami alebo plesňami, je potrebné prijať opatrenia na odstránenie kontaminujúcich organizmov. V prípade rias a väčšiny iných kontaminujúcich organizmov sa to dá docieliť povrchovou sterilizáciou. Vzorka kontaminovaného rastlinného materiálu sa odoberie a korienky sa odstrihnú. Potom sa materiál prudko pretrepe v čistej vode, následne sa ponorí do 0,5 % (v/v) roztoku chlórnanu sodného na 30 sekúnd až 5 minút. Rastlinný materiál sa potom opláchne sterilnou vodou a prenesie v niekoľkých dávkach do kultivačných nádob obsahujúcich čerstvé rastové médium. V dôsledku tohto postupu veľa lístkov uhynie, najmä ak sa použijú dlhšie expozičné časy, ale tie, ktoré prežijú, sú obvykle nekontaminované. Tieto sa môžu potom použiť na opätovné naočkovanie nových kultúr.

▼M1

Dodatok 3

Médiá

Odporúčajú sa rôzne rastové médiá pre *L. minor* a *L. gibba*. Pre *L. minor* sa odporúča modifikované médium podľa švédskej normy (SIS), zatiaľ čo pre *L. gibba* sa odporúča médium 20X AAP. Zloženia oboch médií sú uvedené nižšie. Pri príprave týchto médií sa musia použiť reagencie alebo chemikálie analytickej kvality a deionizovaná voda.

Rastové médium podľa švédskej normy (SIS) pre rastliny rodu *Lemna*

— Zásobné roztoky I – V sa sterilizujú v autokláve (120 °C, 15 minút) alebo membránovou filtráciou (veľkosť pórov približne 0,2 μm).

— Zásobný roztok VI (a voliteľne VII) sa sterilizuje iba membránovou filtráciou, nie je potrebné ho autoklávovať.

— Sterilné zásobné roztoky sa skladujú v chlade a tme. Zásobné roztoky I – V sa musia vyradiť po šiestich mesiacoch, zatiaľ čo zásobný roztok VI (a voliteľne VII) má čas použiteľnosti jeden mesiac.

Zásobný roztok č.	Látka	Koncentrácia v zásobnom roztoku ($g \cdot l^{-1}$)	Koncentrácia v pripravenom médiu ($mg \cdot l^{-1}$)	Pripravené médium	
				Prvok	Koncentrácia ($mg \cdot l^{-1}$)
I	$NaNO_3$	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH_2PO4	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na_2CO_3	4,0	20	C	2,3
V	H_3BO_3	1,0	1,00	B	0,17
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,20	0,20	Mn	0,056
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,010	0,010	Mo	0,0040
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,050	0,050	Zn	0,011
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na_2-EDTA·$2H_2O$	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (tlmiaci roztok)	490	490	—	—

— Na prípravu jedného litra média SIS sa pridá do 900 ml deionizovanej vody:

— 10 ml zásobného roztoku I

— 5 ml zásobného roztoku II

— 5 ml zásobného roztoku III

— 5 ml zásobného roztoku IV

▼M1

— 1 ml zásobného roztoku V

— 5 ml zásobného roztoku VI

— 1 ml zásobného roztoku VII (voliteľné).

Poznámka: Ďalší zásobný roztok VII (tlmivý roztok MOPS) môže byť potrebný pre určité testované látky (pozri posledný odsek v oddiele 1.4).

— pH sa nastaví na 6,5 ± 0,2 buď 0,1, alebo 1 mol HCl, alebo NaOH a objem sa doplní do jedného litra deionizovanou vodou.

Rastové médium 20X AAP

Zásobné roztoky sa pripravia v sterilnej destilovanej alebo deionizovanej vode.

Sterilné zásobné roztoky sa skladujú v chlade a tme. V týchto podmienkach budú mať zásobné roztoky čas trvanlivosti minimálne 6 – 8 týždňov.

Pre médium 20X – AAP sa pripraví päť živných zásobných roztokov (A1, A2, A3, B a C) a použijú sa chemikálie reagenčnej kvality. Na prípravu rastového média sa pridá 20 ml každého živného zásobného roztoku do približne 850 ml deionizovanej vody. pH sa nastaví na 7,5 ± 0,1 buď 0,1, alebo 1 mol HCl, alebo NaOH a objem sa doplní do jedného litra deionizovanou vodou. Médium sa potom prefiltruje do sterilnej nádoby cez 0,2 μm (približne) membránový filter.

Rastové médium určené na testovanie sa musí pripraviť 1 – 2 dni pred použitím, aby sa stabilizovalo pH. Pred použitím sa skontroluje pH rastového média a v prípade potreby sa znovu upraví pridaním 0,1 alebo 1 M NaOH, alebo HCl, ako sa uvádza vyššie.

Zásobný roztok č.	Látka	Koncentrácia v zásobnom roztoku ($g \cdot l^{-1}$) (*)	Koncentrácia v pripravenom médiu($mg \cdot l^{-1}$) (*)	Pripravené médium	
				Prvok	Koncentrácia ($mg \cdot l^{-1}$) (*)
A1	$NaNO_3$	26	510	Na; N	190; 84
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12	240	Mg	58,08
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15	290	S	38,22
A3	$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	1,4	30	K; P	9,4;3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,16	3,2	Fe	0,66
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0,30	6,0	—	—
	$ZnCl_2$	3,3 $mg \cdot l^{-1}$	66 $\mu g \cdot l^{-1}$	Zn	31 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,4 $mg \cdot l^{-1}$	29 $\mu g \cdot l^{-1}$	Co	7,1 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,3 $mg \cdot l^{-1}$	145 $\mu g \cdot l^{-1}$	Mo	58 $\mu g \cdot l^{-1}$
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012 $mg \cdot l^{-1}$	0,24 $\mu g \cdot l^{-1}$	Cu	0,080 $\mu g \cdot l^{-1}$
C	$NaHCO_3$	15	300	Na; C	220; 43

(*) Pokiaľ nie je známa.

▼M1

Poznámka: Teoreticky vhodná konečná koncentrácia hydrogenuhličitanu (ktorým by sa zabránilo značnému upravovaniu pH) je 15 mg/l, a nie 300 mg/l. Používanie 20X AAP média v minulosti vrátane kruhového testu pre túto metódu je založené na 300 mg/l [I. Sims, P. Whitehouse and R. Lacey. (1999) The OECD *Lemna* Growth Inhibition Test. Development and Ring-testing of draft OECD Test Guideline. R&D Technical Report EMA 003. WRc plc – Environment Agency].

STEINBERGOVO médium (podľa ISO 20079)

Koncentrácie a zásobné roztoky

— Modifikované Steinbergovo médium sa používa v ISO 20079 pre samotné *Lemna minor* (lebo iba *Lemna minor* je v tomto prípade povolená), ale z testov vyplýva, že dobré výsledky sa dajú dosiahnuť aj s *Lemna gibba*.

— Pri príprave média sa musia použiť reagencie alebo chemické látky reagenčnej alebo analytickej kvality a deionizovaná voda.

— Príprava živného média zo zásobných roztokov alebo 10-krát koncentrovaného média, ktoré umožňuje maximálnu koncentráciu média bez vyzrážania.

Tabuľka 1

pH-stabilizované STEINBERGOVO médium (modifikované podľa Altenburgera)

Látka		Živné médium	
Makroprvky	mol. hmotnosť	mg/l	mmol/l
KNO_3	101,12	350,00	3,46
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236,15	295,00	1,25
KH_2PO_4	136,09	90,00	0,66
K_2HPO_4	174,18	12,60	0,072
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246,37	100,00	0,41
Mikroprvky	mol. hmotnosť	µg/l	µmol/l
H_3BO_3	61,83	120,00	1,94
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287,43	180,00	0,63
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241,92	44,00	0,18
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	197,84	180,00	0,91
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270,21	760,00	2,81
EDTA dinátrium-dihydrát	372,24	1 500,00	4,03

▼**M1**

Tabuľka 2

Zásobné roztoky (Makroprvky)

1. **Makroprvky (50-krát koncentrovaný)**	g/l
Zásobný roztok 1:	
KNO_3	17,50
KH_2PO_4	4,5
K_2HPO_4	0,63
Zásobný roztok 2:	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Zásobný roztok 3:	
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	14,75

Tabuľka 3

Zásobné roztoky (Mikroprvky)

2. **Mikroprvky (1 000-krát koncentrovaný)**	mg/l
Zásobný roztok 4:	
H_3BO_3	120,0
Zásobný roztok 5:	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	180,0
Zásobný roztok 6:	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	44,0
Zásobný roztok 7:	
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	180,0
Zásobný roztok 8:	
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	760,00
EDTA dinátrium-dihydrát	1 500,00

— Môžu sa použiť zásobné roztoky 2 a 3 a samostatne 4 až 7 (pri zohľadnení požadovaných koncentrácií).

— Na dlhší čas trvanlivosti sterilizujte zásobné roztoky v autokláve pri 121 °C 20 min. alebo alternatívne sterilne prefiltrujte (0,2 μm). Pre zásobný roztok 8 sa dôrazne odporúča sterilná filtrácia (0,2 μm).

Príprava konečnej koncentrácie STEINBERGOVHO média (modifikované)

— Pridajte 20 ml zásobných roztokov 1, 2 a 3 (pozri tabuľku 2) do približne 900 ml deionizovanej vody, aby ste zabránili vyzrážaniu.

— Pridajte 1,0 ml zásobných roztokov 4, 5, 6, 7 a 8 (pozri tabuľku 3).

— pH musí byť 5,5 ± 0,2 (upravte pridaním minimálneho objemu roztoku NaOH alebo HCl).

▼**M1**

— Doplňte vodou do 1 000 ml.

— Ak sú roztoky sterilné a používa sa vhodná voda, ďalšia sterilizácia nie je potrebná. Ak sa sterilizuje konečné médium, zásobný roztok 8 sa musí pridať po autoklávovaní (20 min. pri 121 °C).

Príprava 10-krát koncentrovaného STEINBERGOVHO média (modifikovaného) na dočasné skladovanie

— Pridajte 20 ml zo zásobných roztokov 1, 2 a 3 (pozri tabuľku 2) približne do 30 ml vody, aby ste zabránili vyzrážaniu.

— Pridajte 1,0 ml zo zásobných roztokov 4, 5, 6, 7 a 8 (pozri tabuľku 3). Doplňte vodou do 100 ml.

— Ak sú roztoky sterilné a používa sa vhodná voda, ďalšia sterilizácia nie je potrebná. Ak sa sterilizuje konečné médium, zásobný roztok 8 sa musí pridať po autoklávovaní (20 min. pri 121 °C).

— pH média (konečná koncentrácia) musí byť 5,5 ± 0,2.

▼M4

C.27 **TEST TOXICITY CHIRONOMIDAE V SYSTÉME SEDIMENT – VODA ZA POUŽITIA OBOHATENÉHO SEDIMENTU**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s Usmerneniami OECD na vykonávanie testov (TG) 218 (2004). Táto testovacia metóda bola vypracovaná s cieľom hodnotiť účinky predĺženého pôsobenia chemikálií na vodné larvy dvojkrídlovcov rodu *Chironomus* žijúce v sedimente. Vychádza z existujúcich protokolov o testoch toxicity pri druhoch *Chironomus riparius* a *Chironomus tentans*, ktoré boli vypracované v Európe (1) (2) (3) a Severnej Amerike (4) (5) (6) (7) (8) a boli podrobené kruhovým testom (1) (6) (9). Môžu sa použiť aj iné dobre zdokumentované druhy pakomárov, napr. *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).

2. Expozičný scenár použitý v tejto testovacej metóde je obohacovanie sedimentu testovanou látkou. Výber vhodného expozičného scenára závisí od plánovaného použitia testu. Scenár obohacovania sedimentu je určený na simuláciu akumulovaných úrovní chemikálií pretrvávajúcich v sedimente. Tento expozičný systém zahŕňa obohacovanie sedimentu v testovacom systéme sediment – voda.

3. Látky, ktoré je potrebné testovať na organizmoch žijúcich v sedimente, zvyčajne pretrvajú v tomto kompartmente dlhý čas. Organizmy žijúce v sedimente môžu byť exponované viacerými spôsobmi. Relatívny význam každého spôsobu expozície a časové obdobie, v ktorom sa každý z nich podieľa na celkových toxických účinkoch, závisí od fyzikálno-chemických vlastností danej chemikálie. V prípade silno adsorbujúcich látok (napr. s log K_{ow} > 5) alebo látok, ktoré sa kovalentne viažu na sediment, môže byť významným spôsobom expozície prijímanie kontaminovanej potravy. S cieľom zabrániť podhodnoteniu toxicity vysokolipofilných látok možno zvážiť použitie potravy pridanej do sedimentu pred aplikáciou testovanej látky. S cieľom zohľadniť všetky potenciálne spôsoby expozície sa táto testovacia metóda zameriava na dlhodobú expozíciu. Trvanie testu je v rozsahu 20 – 28 dní v prípade druhov *C. riparius* a *C. yoshimatsui* a 28 – 65 dní pri *C. tentans*. Ak sú na špecifické účely potrebné krátkodobé údaje, napríklad s cieľom skúmať účinky nestabilnej chemikálie, môžu sa po desiatich dňoch odstrániť ďalšie replikáty.

4. Meranými parametrami sú celkový počet vykuklených dospelých jedincov a čas do vykuklenia. Ak sú potrebné ďalšie krátkodobé údaje, odporúča sa vykonať merania prežitia a rastu lariev až po desiatich dňoch s použitím ďalších replikátov podľa potreby.

5. Odporúča sa použiť umelo pripravený sediment. Umelo pripravený sediment má oproti prírodným sedimentom niekoľko výhod:

— zníži sa variabilita testu, lebo umelo pripravený sediment vytvára reprodukovateľnú „štandardizovanú matricu“, a odstráni sa potreba nájsť nekontaminované a čisté zdroje sedimentu,

— testy je možné začať kedykoľvek bez problému sezónnej variability v testovanom sedimente a nie je potrebné sediment predpripraviť, aby sa odstránila pôvodná fauna. Použitie umelo pripraveného sedimentu takisto znižuje náklady spojené s odberom dostatočných množstiev sedimentu v teréne na rutinné testovanie,

— použitie umelo pripraveného sedimentu umožňuje porovnanie toxicity a následné zatriedenie látok.

6. Vymedzenie pojmov je uvedené v dodatku 1.

▼M4

PRINCÍP TESTU

7. Larvy pakomárov v prvom instare sú exponované rozsahu koncentrácií testovanej chemikálie v systémoch sediment – voda. Sediment sa obohatí testovanou látkou a následne sa larvy prvého instaru zavedú do testovacích kadičiek, v ktorých sa stabilizovali koncentrácie sedimentu a vody. Na konci testu sa meria vykuklenie pakomárov a vývojový pomer. Podľa potreby sa môže po desiatich dňoch merať aj prežitie a hmotnosť lariev (pomocou ďalších replikátov podľa potreby). Tieto údaje sa analyzujú buď prostredníctvom regresného modelu na odhadnutie koncentrácie, ktorá by spôsobila × % pokles vo vykuklení, prežívaní lariev alebo raste (napr. EC_{15}, EC_{50} atď.), alebo prostredníctvom testovania štatistickej hypotézy na stanovenie koncentrácie NOEC/LOEC. Pri druhom spôsobe je potrebné pomocou štatistických testov porovnať hodnoty účinkov s kontrolnými hodnotami.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

8. Je potrebné poznať rozpustnosť testovanej látky vo vode, jej tlak pary, namerané alebo vypočítané delenie na sediment a stabilitu vo vode a v sedimente. Mala by byť k dispozícii spoľahlivá analytická metóda so známou a zdokumentovanou presnosťou a detekčným limitom na kvantifikáciu testovanej látky v nadložnej vode, pórovej vode a sedimente. Medzi užitočné informácie patrí štrukturálny vzorec a čistota testovanej látky. Užitočnou informáciou je aj chemický osud testovanej chemikálie (napr. rozptýlenie, abiotická a biotická degradácia atď.). Ďalšie informácie pre testované látky s fyzikálno-chemickými vlastnosťami, ktoré sťažujú ich testovanie, sú uvedené v odkaze (12).

REFERENČNÉ CHEMIKÁLIE

9. Referenčné chemikálie sa môžu testovať pravidelne ako prostriedok na zabezpečenie spoľahlivosti testovacieho protokolu a testovacích podmienok. Príkladmi referenčných toxických látok, ktoré sa úspešne používajú v kruhových testoch a overovacích štúdiách, sú: lindán, trifluralín, pentachlórfenol, chlorid kademnatý a chlorid draselný (1) (2) (5) (6) (13).

PLATNOSŤ TESTU

10. Pre platnosť testu je potrebné uplatňovať tieto podmienky:

— vykuklenie v kontrolných skupinách musí byť na konci testu na úrovni minimálne 70 % (1) (6),

— vykuklenie druhov *C. riparius* a *C. yoshimatsui* na dospelé jedince z kontrolných nádob by malo nastať 12 – 23 dní po ich vložení do nádob. V prípade druhu C. tentans je potrebné obdobie 20 – 65 dní,

— na konci testu je potrebné zmerať v každej nádobe pH a koncentráciu rozpusteného kyslíka. Koncentrácia kyslíka by pri použitej teplote mala predstavovať najmenej 60 % saturačnej hodnoty vzduchom (ASV) a hodnota pH nadložnej vody by vo všetkých testovacích nádobách mala byť v rozmedzí 6 – 9,

— teplota vody by sa nemala líšiť o viac ako ± 1,0 °C. Teplotu vody je možné kontrolovať pomocou izotermickej komory a v tom prípade je potrebné v primeranom časovom intervale potvrdiť teplotu v komore.

▼M4

OPIS METÓDY

Testovacie nádoby

11. Štúdia sa vykonáva v sklenených kadičkách s objemom 600 ml a s priemerom 8 cm. Sú vhodné aj iné nádoby, ale musia zaručiť vhodnú hĺbku nadložnej vody a sedimentu. Povrch sedimentu by mal byť dostatočne veľký, aby poskytoval 2 – 3 cm^2 priestoru na larvu. Pomer hĺbky vrstvy sedimentu k hĺbke nadložnej vody by mal byť 1: 4. Testovacie nádoby a iné prístroje, ktoré prichádzajú do styku s testovacím systémom, by mali byť vyrobené výlučne zo skla alebo iného chemicky inertného materiálu (napr. teflónu).

Výber druhov

12. Uprednostňovaným druhom na použitie v teste je *Chironomus riparius*. *Chironomus tentans* je takisto vhodný, ale je náročnejší na starostlivosť a vyžaduje si dlhšie trvanie testu. Možno použiť aj *Chironomus yoshimatsui*. Podrobné informácie o kultivačných metódach v prípade druhu *Chironomus riparius* sú uvedené v dodatku 2. Informácie o kultivačných podmienkach sú k dispozícii aj pre iné druhy, t. j. *Chironomus tentans* (4) a *Chironomus yoshimatsui* (11). Identifikácia druhov musí byť pred testovaním potvrdená, ale nevyžaduje sa pred každým testom, ak organizmy pochádzajú z internej kultúry.

Sediment

13. Uprednostňuje sa použitie umelo pripraveného sedimentu (známeho aj pod názvom rekonštituovaný, umelý alebo syntetický sediment). Ak sa však použije prírodný sediment, je potrebné ho charakterizovať (aspoň pH, obsah organického uhlíka, odporúča sa takisto stanovenie ostatných parametrov ako pomer C/N a granulometria) a nemal by obsahovať žiadne kontaminanty ani iné organizmy, ktoré by mohli s pakomármi súperiť alebo ich požierať. Takisto sa odporúča, aby bol prírodný sediment pred použitím v teste toxicity pri pakomároch na sedem dní uvedený do podmienok, ktoré budú prevládať v nasledujúcom teste. V tomto teste (1) (15) (16) sa odporúča použiť nasledujúci umelo pripravený sediment založený na umelej pôde použitej v testovacej metóde C.8 (14):

a) 4 – 5 % (suchá hmotnosť) rašeliny: čo najbližšie k pH 5,5 – 6,0. Je dôležité použiť rašelinu v práškovej forme, jemne rozomletú (veľkosť častíc ≤ 1 mm) a sušenú iba vzduchom;

b) 20 % (suchá hmotnosť) kaolínu (obsah kaolinitu podľa možnosti nad 30 %);

c) 75 – 76 % (suchá hmotnosť) kremenného piesku (mal by prevládať jemný piesok s viac ako 50 % častíc s veľkosťou od 50 do 200 μm);

d) deionizovaná voda sa pridá, aby sa dosiahla vlhkosť konečnej zmesi v rozsahu 30 - 50 %;

e) uhličitan vápenatý chemicky čistej kvality ($CaCO_3$) sa pridá, aby sa pH konečnej zmesi sedimentu upravila na 7,0 ± 0,5; obsah organického uhlíka v konečnej zmesi by mal byť 2 % (± 0,5 %) a je potrebné ho upraviť pomocou primeraného množstva rašeliny a piesku podľa písmen a) a c).

14. Zdroj rašeliny, kaolínu a piesku by mal byť známy. Je potrebné skontrolovať, či zložky sedimentu neobsahujú chemické kontaminanty (napr. ťažké kovy, organochlórové zlúčeniny, organofosforové zlúčeniny atď.). Príklad prípravy umelo pripraveného sedimentu je uvedený v dodatku 3. Miešanie suchých zložiek je takisto prípustné, ak sa preukáže, že po pridaní nadložnej vody nedochádza k separácii zložiek sedimentu (napr. k vyplaveniu častíc rašeliny) a že rašelina alebo sediment sú v dostatočnej miere uvedené do podmienok.

▼M4

Voda

15. Každá voda, ktorá vyhovuje chemickým charakteristikám prijateľnej riediacej vody podľa zoznamu uvedeného v dodatkoch 2 a 4, je vhodná ako testovacia voda. Každá vhodná voda, prírodná voda (povrchová alebo podzemná voda), rekonštituovaná voda (pozri dodatok 2) alebo odchlórovaná voda z vodovodu sú prijateľné ako voda na kultiváciu a testovacia voda, ak v nej pakomáre prežijú počas celej kultivácie a testovania bez príznakov stresu. Na začiatku testu by pH testovacej vody mala mať hodnotu medzi 6 a 9 a celková tvrdosť by nemala byť vyššia ako 400 mg/l pre $CaCO_3$. Ak však existuje podozrenie na interakciu medzi iónmi tvrdosti a testovanou látkou, mala by sa použiť voda s nižšou tvrdosťou (a v takom prípade sa teda nesmie použiť Elendtovo médium M4). Počas celej štúdie by sa mal používať rovnaký druh vody. Charakteristiky kvality vody uvedené v dodatku 4 by sa mali merať najmenej dvakrát za rok alebo ak existuje podozrenie, že sa tieto charakteristiky mohli významne zmeniť.

Zásobné roztoky – obohatené sedimenty

16. Obohatené sedimenty vybratej koncentrácie sa zvyčajne pripravujú pridaním roztoku testovanej látky priamo do sedimentu. Zásobný roztok testovanej látky rozpustenej v deionizovanej vode sa zmieša s umelo pripraveným sedimentom pomocou valcovne, stroja na miešanie krmív alebo ručným miešaním. Ak je testovaná látka slabo rozpustná vo vode, možno ju rozpustiť v čo najmenšom objeme vhodného organického rozpúšťadla (napr. hexán, acetón alebo chloroform). Tento roztok sa následne zmieša s 10 g jemného kremenného piesku na jednu testovaciu nádobu. Počká sa, kým sa rozpúšťadlo odparí, pričom sa musí z piesku celkom odstrániť. Piesok sa potom zmieša s vhodným množstvom sedimentu na testovaciu kadičku. Na zvýšenie rozpustnosti, na disperziu alebo na emulziu testovanej látky možno použiť iba látky, ktoré sú ľahko prchavé. Treba mať na pamäti, že pri príprave sedimentu je nutné zohľadniť piesok, ktorý pochádza z testovanej látky a pieskovej zmesi (t. j. sediment by sa teda mal pripraviť s menším množstvom piesku). Je nutné zabezpečiť, aby sa testovaná látka pridávaná do sedimentu v sedimente dôkladne a rovnomerne distribuovala. V prípade potreby možno na účely stanovenia stupňa homogenity analyzovať podvzorky.

KONCEPCIA TESTU

17. Koncepcia testu sa vzťahuje na výber počtu a odstup testovaných koncentrácií, počet nádob pri každej koncentrácii a počet lariev v každej nádobe. Sú tu opísané koncepcie na odhadnutie bodu EC, na odhadnutie koncentrácie NOEC a na vykonanie limitného testu.

Koncepcia regresnej analýzy

18. Účinná koncentrácia (napr. EC_{15}, EC_{50}) a koncentračný rozsah, v ktorom sa skúmajú účinky testovanej látky, sa merajú koncentráciami zahrnutými do testu. Vo všeobecnosti sú presnosť a najmä platnosť, s ktorou možno odhadovať účinné koncentrácie (EC_x), lepšie, ak je účinná koncentrácia v rozsahu testovaných koncentrácií. Je potrebné vyhýbať sa extrapolácii hlboko pod najnižšou pozitívnou koncentráciou alebo nad najvyššou koncentráciou. Pri výbere rozsahu koncentrácií, ktoré sa použijú, je užitočný predbežný test na zistenie rozsahu (pozri odsek 27).

▼M4

19. Ak je potrebné odhadnúť EC_x, malo by sa testovať najmenej päť koncentrácií a tri replikáty pre každú koncentráciu. V každom prípade sa odporúča použiť dostatočné testovacie koncentrácie, ktoré umožnia dobrý modelový odhad. Faktor medzi koncentráciami by nemal byť väčší ako dva (v prípadoch, keď má krivka závislosti reakcie od dávky plytký sklon, možno urobiť výnimku). Počet replikátov pri každej aplikácii sa môže znížiť, ak sa zvýši počet testovacích koncentrácií s rozdielnymi reakciami. Zvýšenie počtu replikátov alebo skrátenie dĺžky intervalov testovacích koncentrácií zvyčajne vedie k nižším intervalom spoľahlivosti testu. Ak sa odhaduje desaťdňové prežívanie a rast lariev, sú potrebné ďalšie replikáty.

Koncepcia odhadu NOEC/LOEC

20. Ak sa odhadujú koncentrácie LOEC alebo NOEC, použije sa päť testovacích koncentrácií s najmenej štyrmi replikátmi a faktor medzi koncentráciami by nemal byť vyšší ako 2. Počet replikátov by mal byť dostatočný, aby sa zabezpečila primeraná štatistická výpovedná hodnota na zistenie rozdielu 20 % pri kontrole pri úrovni významnosti 5 % (p = 0,05). V prípade vývojového pomeru je zvyčajne vhodná analýza rozptylu (ANOVA), ako napríklad Dunnettov test a Williamsov test (17) (18) (19) (20). Pri pomere vykuklenia možno použiť Cochranov-Armitageho test, Fisherov exaktný test (s Bonferroniho korekciou) alebo Mantelov-Haenszelov test.

Limitný test

21. Môže sa vykonať limitný test (jedna testovaná koncentrácia a kontrola), ak v predbežnom teste na zistenie rozsahu neboli pozorované žiadne účinky. Účelom limitného testu je vykonať test pri dostatočne vysokej koncentrácii, ktorá umožní subjektom zodpovedným za rozhodovanie vylúčiť možné toxické účinky testovanej látky a stanoviť limit pri koncentrácii, ktorá sa neočakáva v žiadnej situácii. Odporúča sa úroveň 1 000 mg/kg (suchá hmotnosť). Zvyčajne je na aplikáciu aj kontrolu potrebných najmenej šesť replikátov. Je nutné preukázať primeranú štatistickú výpovednú hodnotu na zistenie rozdielu 20 % pri kontrole pri úrovni významnosti 5 % (p = 0,05). V prípade metrickej reakcie (vývojový pomer a hmotnosť) je vhodnou štatistickou metódou t-test, pokiaľ údaje spĺňajú požiadavky tohto testu (normalita, homogénne rozptyly). Ak tieto požiadavky nie sú splnené, môže sa použiť t-test nerovnomerných rozptylov alebo neparametrický test ako napríklad Wilcoxonov-Mannov-Whitheyho test. Pri pomere vykuklenia je vhodný Fisherov exaktný test.

POSTUP

Podmienky expozície

Príprava systému obohatený sediment – voda

22. Postup obohacovania opísaný v testovacej metóde C.8: Toxicita pre dážďovky je odporúčaným postupom na aplikáciu testovanej látky (14). Obohatené sedimenty sa umiestnia do nádob, do ktorých sa pridá nadložná voda, aby sa vytvoril objemový pomer sediment – voda 1: 4 (pozri odseky 11 a 15). Výška vrstvy sedimentu by mala byť v rozsahu 1,5 - 3 cm. S cieľom zabrániť separácii zložiek sedimentu a resuspendovaniu jemného materiálu počas pridávania testovacej vody do vodného stĺpca môže byť sediment v čase, keď sa naň nalieva voda, prikrytý umelohmotným kotúčom, ktorý sa hneď potom odstráni. Môže byť vhodné aj použitie iných prístrojov.

23. Testovacie nádoby sa zakryjú (napr. sklenenými platňami). V prípade potreby sa počas štúdie dopĺňajú hladiny vody na pôvodný objem s cieľom kompenzovať vyparovanie vody. Na tento účel sa použije destilovaná alebo deionizovaná voda, aby sa predišlo hromadeniu solí.

▼M4

Stabilizácia

24. Keď je obohatený sediment s nadložnou vodou pripravený, je vhodné umožniť delenie testovanej látky z vodnej fázy do sedimentu (3) (4) (6) (13). To by sa podľa možnosti malo vykonať za rovnakých teplotných a prevzdušňovacích podmienok, aké sa použijú v teste. Primeraný čas vyvažovania závisí od konkrétneho sedimentu a chemikálie a môže trvať niekoľko hodín až dní a v zriedkavých prípadoch až niekoľko týždňov (štyri až päť týždňov). Keďže tým by sa poskytol čas na degradáciu mnohých chemikálií, na rovnovážny stav sa nečaká, ale odporúča sa vyvažovacie obdobie v trvaní 48 hodín. Na konci tohto ďalšieho vyvažovacieho obdobia sa odmeria koncentrácia testovanej látky v nadložnej vode, pórovej vode a sedimente aspoň pri najvyššej koncentrácii a pri jednej nižšej koncentrácii (pozri odsek 38). Tieto analytické skúmania testovanej látky umožňujú výpočet hmotnostnej bilancie a vyjadrenie výsledkov na základe meraných koncentrácií.

Pridanie testovacích organizmov

25. Štyri až päť dní pred pridaním testovacích organizmov do testovacích nádob sa z kultúr odoberú vajíčkové masy a umiestnia sa do malých nádob s kultivačných médiom. Môže sa použiť staršie médium zo zásobnej kultúry alebo čerstvo pripravené médium. Ak sa použije čerstvo pripravené kultivačné médium, je potrebné doň pridať malé množstvo potravy, napr. zelené riasy a/alebo niekoľko kvapiek filtrátu z jemne rozomletej suspenzie vločkového krmiva pre ryby (pozri dodatok 2). Použijú sa iba čerstvo nakladené vajíčkové masy. Larvy sa zvyčajne začnú liahnuť niekoľko dní po nakladení vajíčok (dva až tri dni v prípade druhu *Chironomus riparius* pri teplote 20 °C a jeden až štyri dni v prípade *Chironomus tentans* pri teplote 23 °C a *Chironomus yoshimatsui* pri teplote 25 °C) a rast lariev prebieha v štyroch instaroch, z ktorých každý trvá štyri až osem dní. V teste sa použijú larvy prvého instaru (dva až tri alebo jeden až štyri dni po vyliahnutí). Instar pakomárov je možné skontrolovať podľa šírky hlavového segmentu (6).

26. Larvy 21. instaru sa pomocou tupej pipety náhodne rozdelia do jednotlivých testovacích nádob obsahujúcich obohatený sediment a vodu. Prevzdušňovanie vody je nutné počas pridávania lariev do testovacích nádob prerušiť a musí byť pozastavené počas ďalších 24 hodín po pridaní lariev (pozri odseky 25 a 32). Podľa použitej koncepcie testu (pozri odseky 19 a 20) je počet lariev použitých pri každej koncentrácii najmenej 60 na odhad bodu EC a 80 na stanovenie koncentrácie NOEC.

Testovacie koncentrácie

27. Pri určovaní rozsahu koncentrácií pre konečný test môže byť užitočný test na zistenie rozsahu. Na tento účel sa použije súbor koncentrácií testovanej látky s veľkými odstupmi. S cieľom zabezpečiť rovnakú hustotu povrchu na pakomára, ktorá sa použije pri konečnom teste, sú pakomáre vystavené každej koncentrácii testovanej látky na obdobie, ktoré umožňuje odhad vhodných testovacích koncentrácií, pričom nie sú potrebné žiadne replikáty.

28. Testovacie koncentrácie pre konečný test sa vyberú na základe výsledkov testu na zistenie rozsahu. Je potrebné použiť a vybrať najmenej päť koncentrácií, ako sa uvádza v odsekoch 18 – 20.

▼M4

Kontroly

29. Súčasťou testu sú kontrolné nádoby bez prítomnosti testovanej látky, ktoré však obsahujú sediment, a primeraný počet replikátov (pozri odseky 19 – 20). Ak sa pri aplikácii testovanej látky použije rozpúšťadlo (pozri odsek 16), je potrebné pridať kontrolu rozpúšťadla v sedimente.

Testovací systém

30. Použijú sa statické systémy. Vo výnimočných prípadoch sa môžu použiť semistatické alebo prietokové systémy s prerušovaným alebo nepretržitým obmieňaním nadložnej vody, napríklad ak sú špecifikácie kvality vody nevhodné pre testovacie organizmy alebo ak ovplyvňujú chemickú rovnováhu (napr. úrovne rozpusteného kyslíka príliš klesnú, koncentrácia vylučovaných produktov príliš stúpne alebo sa zo sedimentu lúhujú minerály, čo má vplyv na pH a/alebo tvrdosť vody). Zvyčajne však postačujú a uprednostňujú sa iné metódy zlepšenia kvality nadložnej vody, ako napríklad prevzdušňovanie.

Potrava

31. Je nevyhnutné larvy kŕmiť podľa možnosti každý deň alebo najmenej trikrát do týždňa. V prvých desiatich dňoch je pre mladé larvy podľa všetkého vhodné krmivo pre ryby (suspenzia vo vode alebo jemne rozomletá potrava, napr. Tetra-Min alebo Tetra-Phyll, bližšie informácie pozri v dodatku 2) v dennom množstve 0,25 – 0,5 mg (0,35 – 0,5 mg pre druh *C. yoshimatsui*) na jednu larvu. Pre staršie larvy môže byť potrebné o niečo väčšie množstvo potravy: denné množstvo 0,5 – 1 mg na jednu larvu by malo po zvyšok testu postačovať. Ak sa pozoruje rast hubovitých organizmov alebo ak sa v kontrolných nádobách pozoruje mortalita, prídel potravy by sa mal vo všetkých testovacích nádobách znížiť a mal by sa kontrolovať. Ak nie je možné vznik hubovitých organizmov zastaviť, test je nutné opakovať. Pri testovaní silno adsorbujúcich látok (napr. s log K_{ow} > 5) alebo látok, ktoré sa kovalentne viažu na sediment, sa môže do umelo pripraveného sedimentu pred stabilizačným obdobím pridať množstvo potravy potrebné na zabezpečenie prežitia a prirodzeného rastu organizmov. Na tento účel sa namiesto krmiva pre ryby musí použiť rastlinný materiál, napr. sa môže pridať 0,5 % (suchá hmotnosť) jemne rozomletých listov napr. pŕhľavy dvojdomej (*Urtica dioica*), moruše (*Morus alba*), ďateliny plazivej (*Trifolium repens*), špenátu (*Spinacia oleracea*) alebo iného rastlinného materiálu (*Cerophyl* alebo alfa celulóza).

Podmienky inkubácie

32. Najlepšie po 24 hodinách od pridania lariev sa zabezpečí jemné prevzdušňovanie nadložnej vody v testovacích nádobách a pokračuje v ňom počas celého testu (treba dbať na to, aby koncentrácia rozpusteného kyslíka neklesla pod 60 % ASV). Prevzdušňovanie sa zabezpečí pomocou sklenenej Pasteurovej pipety upevnenej 2 – 3 cm nad vrstvou sedimentu (t. j. jedna alebo niekoľko bublín za sekundu). Ak sa testujú prchavé chemikálie, možno zvážiť, že systém sediment – voda sa nebude prevzdušňovať.

33. Test sa vykonáva pri konštantnej teplote 20 °C (± 2 °C). V prípade druhu *C. tentans* sa odporúča teplota 23 °C a v prípade *C. yoshimatsui* 25 °C (± 2 °C). Použije sa 16-hodinová svetlá fáza, pričom intenzita svetla by mala byť 500 – 1 000 luxov.

▼M4

Trvanie expozície

34. Expozícia sa začne pridaním lariev do obohatených a kontrolných nádob. Maximálna dĺžka expozície je 28 dní v prípade druhov *C. riparius* a *C. yoshimatsui* a 65 dní v prípade *C. tentans*. Ak sa pakomáre vykuklia skôr, test sa môže ukončiť najskôr po piatich dňoch po vykuklení posledného dospelého jedinca v kontrolnej skupine.

Pozorovania

Vykuklenie

35. Určí sa čas vývoja a celkový počet úplne vykuklených samčích a samičích pakomárov. Samčeky sa ľahko identifikujú podľa obrvených tykadiel.

36. Testovacie nádoby je potrebné pozorovať najmenej trikrát do týždňa s cieľom vizuálne zhodnotiť každé abnormálne správanie (napr. opúšťanie sedimentu, nezvyčajné plávanie) v porovnaní s kontrolnou skupinou. Počas obdobia očakávaného vykuklenia je nevyhnutné každý deň spočítať vykuklené pakomáre. Pohlavie a počet úplne vykuklených pakomárov sa zaznamenáva denne. Po identifikácii sa pakomáre vyberú z nádob. Všetky vajíčkové masy nakladené pred ukončením testu sa zaznamenajú a následne odstránia, aby sa predišlo opätovnému zavedeniu lariev do sedimentu. Takisto sa zaznamená počet viditeľných kukiel, ktoré sa nevykuklili. Usmernenie k meraniu vykuklenia je uvedené v dodatku 5.

Rast a prežívanie

37. Ak je potrebné získať údaje o desaťdňovom prežívaní a raste lariev, na začiatku sa pripravia ďalšie testovacie nádoby tak, aby sa mohli následne použiť. Sediment z týchto ďalších nádob sa precedí pomocou cedidla s hrúbkou 250 μm, aby sa zachytili larvy. Kritérium na stanovenie smrti je nehybnosť alebo absencia reakcie na mechanický podnet. Stratené larvy sa takisto počítajú medzi mŕtve (larvy, ktoré uhynuli na začiatku testu, sa mohli rozložiť pôsobením mikróbov). Určí sa suchá hmotnosť (bez popola) lariev, ktoré prežili v každej testovacej nádobe, a vypočíta sa stredná suchá hmotnosť jedincov na jednu nádobu. Je užitočné určiť, do ktorého instaru patria larvy, ktoré prežili. Na toto meranie sa môže použiť šírka hlavového segmentu každého jedinca.

Analytické merania

Koncentrácia testovanej látky

38. Pred začiatkom testu (t. j. pred pridaním lariev) sa pri každom ošetrení z najmenej jednej nádoby odstránia súhrnné vzorky sedimentu na účely analytického stanovenia koncentrácie testovanej látky v sedimente. Odporúča sa, aby sa vzorky nadložnej vody, pórovej vody a sedimentu analyzovali minimálne na začiatku (pozri odsek 24) a na konci testu pri najvyššej koncentrácii a pri jednej nižšej koncentrácii. Tieto skúmania testovanej látky poskytujú informácie o správaní/delení testovanej látky v systéme voda – sediment.

39. Ak sa vykonajú prostredné merania (napr. v deň 7) a ak sú na analýzu potrebné veľké vzorky, ktoré nemožno odobrať z testovacích nádob bez ovplyvnenia testovacieho systému, analytické vyšetrenia je potrebné vykonať na vzorkách z ďalších testovacích nádob, s ktorými sa zaobchádzalo rovnakým spôsobom (vrátane prítomnosti testovacích organizmov), ale ktoré sa nepoužijú na biologické pozorovania.

▼M4

40. Na izolovanie intersticiálnej vody je odporúčaným postupom odstredenie napr. pri 10 000 g a 4 °C počas 30 minút. Ak sa však preukáže, že testovaná látka sa na filtroch neadsorbuje, môže byť prijateľná aj filtrácia. V niektorých prípadoch nemusí byť možné analyzovať koncentrácie v pórovej vode, lebo vzorka je príliš malá.

Fyzikálno-chemické parametre

41. Je potrebné vhodným spôsobom odmerať pH a teplotu v testovacích nádobách (pozri odsek 10). Tvrdosť a amoniak sa merajú v kontrolných nádobách a v jednej testovacej nádobe pri najvyššej koncentrácii na začiatku a na konci testu.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

42. Účelom tohto testu je určiť vplyv testovanej látky na vývojový pomer a celkový počet úplne vykuklených samčích a samičích pakomárov, alebo v prípade desaťdňového testu účinky na prežívanie a hmotnosť lariev. Ak nič nepoukazuje na štatisticky rozdielnu vnímavosť medzi pohlaviami, výsledky pre samčeky a samičky možno na účely štatistických analýz zhrnúť spoločne. Rozdiely vnímavosti medzi pohlaviami sa môžu štatisticky posúdiť napr. tabuľkovým testom $\chi^2 - r \times 2$. Prežívanie lariev a stredná suchá hmotnosť jedincov na jednu nádobu sa podľa potreby musí určiť po desiatich dňoch.

43. Účinné koncentrácie vyjadrené a vychádzajúce zo suchej hmotnosti sa podľa možnosti vypočítajú na základe koncentrácií nameraných v sedimente na začiatku testu (pozri odsek 38).

44. Na vyčíslenie odhadu bodu EC_{50} alebo akejkoľvek inej hodnoty EC_x sa ako pravé replikáty môže použiť štatistika na jednu nádobu. Pri výpočte intervalu spoľahlivosti pre každú hodnotu EC_x je potrebné zohľadniť variabilitu medzi nádobami alebo je nutné preukázať, že táto variabilita je taká malá, že je možné ju ignorovať. Ak sa model upraví metódou najmenších štvorcov, v štatistike na jednu nádobu je potrebné aplikovať transformáciu, aby sa zlepšila homogénnosť rozptylu. Hodnoty EC_x by sa však mali vypočítať po tom, ako sa reakcia transformuje naspäť na pôvodnú hodnotu.

45. Ak je cieľom štatistickej analýzy určenie koncentrácie NOEC/LOEC prostredníctvom testovania hypotézy, je potrebné zohľadniť variabilitu medzi nádobami, napr. pomocou hierarchickej analýzy ANOVA. Alternatívne môžu byť vhodné podrobnejšie testy (21) v prípadoch, keď dochádza k nedodržaniu zvyčajných predpokladov analýzy ANOVA.

Pomer vykuklenia

46. Pomery vykuklenia sú kvantové údaje a môžu sa analyzovať pomocou Cochranovho-Armitageho testu aplikovaného zostupne v prípadoch, keď sa očakáva monotónna reakcia na dávku a tieto údaje zodpovedajú tomuto očakávaniu. Ak to tak nie je, možno použiť Fisherov exaktný test alebo Mantzelov-Haentzalov test s Bonferroniho-Holmovou úpravou hodnôt p. Ak sa medzi replikátmi pri rovnakej koncentrácii preukáže väčšia variabilita, než akú by indikovala binomická distribúcia (často sa uvádza ako „extra-binomická“ variácia), potom by sa mal použiť podrobný Cochranov-Armitageho test alebo Fisherov exaktný test, ako sa navrhuje v bode (21).

▼M4

Určí sa súčet pakomárov vykuklených na jednu nádobu, ne, a vydelí sa počtom zavedených lariev, na:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

kde:

ER = pomer vykuklenia,

n_e = počet pakomárov vykuklených na nádobu,

n_a = počet zavedených lariev na nádobu.

47. Najvhodnejšou alternatívou pri veľkých vzorkách v prípadoch extra binomickej variácie je brať pomer vykuklenia (ER) ako nepretržitú reakciu a použiť postupy, ako je napríklad Williamsov test, ak sa očakáva monotónna reakcia na dávku, ktorá je konzistentná s týmito údajmi o ER. Ak reakcia nie je monotónna, je vhodný Dunnettov test. Za veľkú vzorku sa pokladá vzorka, v ktorej je počet vykuklených aj počet nevykuklených jedincov v každom replikáte (nádobe) vyšší ako päť.

48. Pri aplikovaní metód ANOVA je potrebné najskôr transformovať hodnoty ER pomocou arkussínusovej transformácie druhej odmocniny alebo Freemanovej-Tukeyho transformácie s cieľom získať približnú normálnu distribúciu a vyrovnať rozptyly. Cochranov-Armitageho test, Fisherov exaktný (Bonferroniho) test alebo Mantelov-Haenszelov test možno aplikovať, ak sa použijú absolútne frekvencie. Arkussínusová transformácia druhej odmocniny sa aplikuje pomocou prevrátenej hodnoty sínusu ($\sin^{-1}$) druhej odmocniny ER.

49. Pri pomeroch vykuklenia sa hodnoty EC_x vypočítajú pomocou regresnej analýzy (alebo napr. pomocou modelov probit (22), logit, Weibull, vhodného komerčného softvéru atď.). Ak je regresná analýza neúspešná (napr. ak sú k dispozícii menej ako dve čiastkové reakcie), použijú sa iné neparametrické metódy, ako je metóda pohyblivého priemeru alebo jednoduchá interpolácia.

Vývojový pomer

50. Stredný vývojový čas predstavuje stredné časové rozpätie medzi zavedením lariev (deň 0 testu) a vykuklením pokusnej kohorty pakomárov. (Pri výpočte reálneho vývojového času sa zohľadní vek lariev v čase zavedenia). Vývojový pomer je prevrátená hodnota vývojového času (jednotka: 1/deň) a predstavuje časť vývinu lariev, ktorá prebieha za deň. Pri hodnotení týchto štúdií toxicity v sedimente sa uprednostňuje vývojový pomer, lebo jeho rozptyl je nižší a v porovnaní s vývojovým časom je homogénnejší a bližší normálnej distribúcii. Výkonné parametrické testovacie postupy teda možno lepšie použiť s vývojovým pomerom ako s vývojovým časom. Pre vývojový pomer ako nepretržitú reakciu možno hodnoty EC_x odhadnúť pomocou regresnej analýzy [napr. (23), (24)].

51. Pri nasledujúcich štatistických testoch sa predpokladá, že počet pakomárov pozorovaných v kontrolnom dni × sa vykuklil v strednom časovom intervale medzi dňom × a dňom x - l (l = dĺžka kontrolného intervalu, zvyčajne jeden deň). Stredný vývojový pomer na nádobu sa vypočíta podľa tejto rovnice:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼M4

kde:

$\bar{x}$: stredný vývojový pomer na nádobu,

i: index kontrolného intervalu,

m: maximálny počet kontrolných intervalov,

f_i: počet pakomárov vykuklených v kontrolnom intervale i,

n_e: celkový počet pakomárov vykuklených na konci pokusu, (= $\sum f_i$),

x_i: vývojový pomer pakomárov vykuklených v intervale i;

$$x_i = \frac{1}{\left(day_i - \frac{1_i}{2}\right)}$$

kde:

$deň_i$: kontrolný deň (dni od aplikácie),

l_i: dĺžka kontrolného intervalu i (dni, zvyčajne jeden deň).

Správa o teste

52. Správa o teste musí obsahovať aspoň tieto informácie:

Testovaná látka:

— fyzikálny charakter a významné fyzikálno-chemické vlastnosti (rozpustnosť vo vode, tlak pary, rozdeľovací koeficient v pôde (alebo v sedimente, ak je k dispozícii), stabilita vo vode atď.),

— chemické identifikačné údaje (bežný názov, chemický názov, štruktúrálny vzorec, číslo CAS atď.) vrátane čistoty a analytickej metódy kvantifikácie testovanej látky.

Testovacie druhy:

— použité testovacie zvieratá: druh, vedecký názov, zdroj organizmov a podmienky chovu,

— informácie o manipulácii s vajíčkovými masami a larvami,

— vek testovacích zvierat pri umiestnení do testovacích nádob.

Podmienky testovania:

— použitý sediment, t. j. prírodný alebo umelo pripravený sediment,

— v prípade prírodného sedimentu poloha a opis miesta odobratia vzoriek vrátane histórie kontaminácie, ak je to možné, charakteristiky: pH, obsah organického uhlíka, pomer C/N a granulometria (podľa potreby),

— príprava umelo pripraveného sedimentu: zložky a charakteristiky (obsah organického uhlíka, pH, vlhkosť atď. na začiatku testu),

— príprava testovacej vody (ak sa použije rekonštituovaná voda) a charakteristiky (koncentrácia kyslíka, pH, vodivosť, tvrdosť atď. na začiatku testu),

— výška sedimentu a nadložnej vody,

— objem nadložnej a pórovej vody, hmotnosť mokrého sedimentu s pórovou vodou a bez nej,

▼M4

— testovacie nádoby (materiál a veľkosť),

— metóda obohatenia sedimentu: použité testovacie koncentrácie, počet replikátov a prípadné použitie rozpúšťadiel,

— rovnovážna fáza stabilizácie systému obohatený sediment – voda: trvanie a podmienky,

— inkubačné podmienky: teplota, svetelný cyklus a intenzita, prevdzušňovanie (frekvencia a intenzita),

— podrobné informácie o kŕmení vrátane druhu potravy, prípravy, množstva a kŕmneho režimu.

Výsledky:

— nominálne testovacie koncentrácie, namerané testovacie koncentrácie a výsledky všetkých analýz na stanovenie koncentrácie testovanej látky v testovacej nádobe,

— kvalita vody v testovacích nádobách, t. j. pH, teplota, rozpustený kyslík, tvrdosť a amoniak,

— kompenzácia prípadnej vyparenej testovacej vody,

— počet vykuklených samčích a samičích pakomárov na nádobu na deň,

— počet lariev na nádobu, ktoré sa nevykuklili,

— stredná suchá hmotnosť jednotlivých lariev na nádobu a na instar podľa potreby,

— percentuálne vykuklenie na replikát a testovaciu koncentráciu (samčie a samičie pakomáre spolu),

— stredný vývojový pomer úplne vykuklených pakomárov na replikát a miera ošetrenia (samčie a samičie pakomáre spolu),

— odhady toxických parametrov, napr. ECx (a súvisiace intervaly spoľahlivosti), NOEC a/alebo LOEC a štatistické metódy použité na ich stanovenie,

— rozbor výsledkov vrátane každého vplyvu na výsledok testu vyplývajúceho z odchýlok od tejto testovacej metódy.

LITERATÚRA

1. BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Upravili M. Streloke a H.Köpp. Berlín 1995.

2. Fleming, R. a kol. (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Záverečná správa pre Európsku komisiu. Správa č.: EK, 3738. August 1994. WRc, UK.

3. SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. Zo seminára WOSTA, ktorý sa uskutočnil v Holandsku.

4. ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. s. 1125 – 1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.

5. Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

▼M4

6. US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Druhé vydanie. EPA 600/R-99/064. Marec 2000. Revízia prvého vydania z júna 1994.

7. US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

8. US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

9. Milani, D., Day, K. E., McLeay, D. J., a Kirby, R. S. (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Kanada.

10. Sugaya, Y. (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345 – 350.

11. Kawai, K. (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47 – 57.

12. OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

13. Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

14. Testovacia metóda C.8 tejto prílohy, Toxicita pre dážďovky.

15. Suedel, B. C., a Rodgers, J. H. (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163 – 1175.

16. Naylor, C., a Rodrigues, C. (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291 – 3303.

17. Dunnett, C. W. (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096 – 1121.

18. Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20: 482 – 491.

19. Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103 – 117.

20. Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510 – 531.

21. Rao, J. N. K., a Scott, A. J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577 – 585.

22. Christensen, E. R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213 – 221.

23. Bruce a Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485 – 1494.

24. Slob, W. (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298-312.

▼**M4**

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Na účely tejto testovacej metódy sa používajú tieto vymedzenia pojmov:

Umelo pripravený sediment alebo rekonštituovaný, umelý alebo syntetický sediment, je zmes materiálov použitých na napodobnenie fyzických zložiek prírodného sedimentu.

Nadložná voda je voda umiestnená v testovacej nádobe nad sedimentom.

Intersticiálna voda alebo pórová voda je voda nachádzajúca sa v priestore medzi časticami sedimentu a pôdy.

Obohatený sediment je sediment, do ktorého bola pridaná testovaná látka.

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

▼M4

Dodatok 2

Odporúčania ku kultúre *Chironomus riparius*

1. Larvy rodu *Chironomus* sa môžu chovať v kryštalizačných miskách alebo vo väčších nádobách. Na dno nádoby sa nanesie tenká vrstva jemného kremenného piesku vo výške 5 – 10 mm. Je preukázané, že vhodným substrátom je aj diatomit (napr. Merck, článok 8117) (postačuje tenšia vrstva do výšky len niekoľkých milimetrov). Potom sa pridá vhodná voda do výšky niekoľkých centimetrov. Hladiny vody by sa mali podľa potreby dopĺňať, aby sa kompenzovala strata vyparením a aby sa predišlo vysychaniu. Vodu je možné v prípade potreby vymeniť. Je potrebné zabezpečiť jemné prevzdušňovanie. Misky na chov lariev by mali byť umiestnené vo vhodnej klietke, ktorá zabráni úniku vykuklených dospelých jedincov. Klietka by mala byť dostatočne veľká, aby umožňovala rojenie vykuklených dospelých jedincov, v opačnom prípade by nemuselo dôjsť ku kopulácii (minimálna veľkosť je asi 30 × 30 × 30 cm).

2. Klietky je potrebné udržiavať pri izbovej teplote alebo v miestnosti so stálym prostredím pri teplote 20 ± 2 °C so svetlou fázou v trvaní 16 hodín (intenzita asi 1 000 luxov) a fázou tmy v trvaní 8 hodín. Je preukázané, že vlhkosť vzduchu nižšia ako 60 % RH môže brániť reprodukcii.

Riediaca voda

3. Možno použiť akúkoľvek vhodnú prírodnú alebo syntetickú vodu. Bežne sa používa studňová voda, odchlórovaná voda z vodovodu a umelé médiá (napr. Elendtovo médium „M4“ alebo „M7“, pozri ďalej). Pred použitím je potrebné vodu prevzdušniť. V prípade potreby možno kultivačnú vodu obnoviť opatrným odliatím alebo odčerpaním použitej vody z kultivačných nádob bez toho, aby sa poškodili trubice lariev.

Kŕmenie lariev

4. Larvy rodu *Chironomus* sa kŕmia vločkovým krmivom pre ryby [Tetra Min®, Tetra Phyll® alebo iná podobná značka patentovaného krmiva pre ryby] približným množstvom 250 mg na nádobu na deň. Krmivo sa môže podávať ako suchý rozomletý prášok alebo ako suspenzia vo vode: 1,0 g vločkového krmiva sa pridá do 20 ml riediacej vody a premieša sa, aby sa získala homogénna zmes. Tento prípravok sa môže podávať v množstve približne 5 ml na nádobu na deň (pred použitím pretrepať). Staršie larvy môžu dostávať viac.

5. Kŕmenie sa upraví podľa kvality vody. Ak sa kultivačné médium zakalí, kŕmenie je potrebné obmedziť. Prídavky do krmiva sa musia starostlivo monitorovať. Nedostatok potravy spôsobí, že larvy sa budú presúvať k vodnému stĺpcu, a prebytok potravy spôsobí zvýšenie činnosti mikróbov a zníženie koncentrácií kyslíka. V obidvoch prípadoch môže dôjsť k zníženiu rastových pomerov.

6. Pri založení nových kultivačných nádob sa môžu pridať aj bunky niektorých zelených rias (napr. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*).

Kŕmenie vykuklených dospelých jedincov

7. Z niektorých pokusov vyplýva, že ako potrava pre vykuklené dospelé jedince môže slúžiť vatový tampón napustený nasýteným sacharózovým roztokom.

▼M4

Vykuklenie

8. Pri teplote 20 ± 2 °C sa dospelé jedince začnú kukliť z nádoby na chov lariev po približne 13 – 15 dňoch. Samčeky sa ľahko rozlíšia podľa obrvených tykadiel.

Vajíčkové masy

9. Keď sú v chovnej klietke prítomné dospelé jedince, vo všetkých nádobách na chov lariev je potrebné trikrát do týždňa kontrolovať kladenie želatínových vajíčkových más. Ak sú vajíčkové masy prítomné, opatrne sa odoberú. Mali by sa preniesť na malú misku so vzorkou kultivačnej vody. Vajíčkové masy sa použijú na založenie nových kultivačných nádob (napr. dve až štyri vajíčkové masy na nádobu) alebo sa použijú v testoch toxicity.

10. Larvy prvého instaru by sa mali vyliahnuť po dvoch až troch dňoch.

Založenie nových kultivačných nádob

11. Po vytvorení kultúr by malo byť možné založiť novú nádobu na kultiváciu lariev každý týždeň alebo menej často v závislosti od testovacích požiadaviek, pričom staršie nádoby sa po vykuklení dospelých pakomárov odstránia. Týmto spôsobom sa pri minimálnom riadení zabezpečí pravidelné dopĺňanie dospelých jedincov.

Príprava testovacích roztokov „M4“ a „M7“

12. Elendt (1990) opísal médium „M4“. Médium „M7“ sa pripravuje ako médium „M4“ s výnimkou látok označených v tabuľke 1, pre ktoré sú koncentrácie v médiu „M7“ štyrikrát nižšie ako v médiu „M4“. Publikácia o médiu „M7“ je v štádiu prípravy (Elendt, osobná komunikácia). Testovací roztok by sa nemal pripraviť podľa Elendta a Biasa (1990), lebo koncentrácie $NaSiO_3$ 5 H_2O, $NaNO_3$, KH_2PO_4 a K_2HPO_4 uvedené pre prípravu zásobných roztokov nie sú vhodné.

Príprava média „M7“

13. Každý zásobný roztok (I) sa pripraví jednotlivo a kombinovaný zásobný roztok (II) sa pripraví z týchto zásobných roztokov (I) (pozri tabuľku 1). Na prípravu média „M7“ sa 50 ml z kombinovaného zásobného roztoku (II) a množstvá každého makronutričného zásobného roztoku uvedené v tabuľke 2 doplnia do jedného litra deionizovanej vody. Vitamínový zásobný roztok sa pripraví pridaním troch vitamínov do deionizovanej vody, ako je uvedené v tabuľke 3, a krátko pred použitím sa do konečného média „M7“ pridá 0,1 ml kombinovaného vitamínového zásobného roztoku. (Vitamínový zásobný roztok sa skladuje zmrazený v malých alikvotných častiach.) Médium sa prevzdušňuje a stabilizuje.

LITERATÚRA

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Upravili M. Streloke a H.Köpp. Berlín 1995.

▼M4

Tabuľka 1

Zásobné roztoky stopových prvkov pre médiá M4 a M7

Zásobné roztoky (I)	Množstvo (mg) doplnené do jedného litra deionizovanej vody	Na prípravu kombinovaného zásobného roztoku (II) sa zmiešajú tieto množstvá (ml) zásobných roztokov (I) a doplnia sa do jedného litra deionizovanej vody		Konečné koncentrácie v testovacích roztokoch (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ (1)	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl (1)	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Tieto látky sa líšia v M4 a M7, ako je uvedené vyššie.
(2) Tieto roztoky sa pripravia jednotlivo, potom sa zlejú dokopy a okamžite sa autoklávujú.

Tabuľka 2

Makronutričné zásobné roztoky pre médiá M4 a M7

	Množstvo doplnené do jedného litra deionizovanej vody (mg)	Množstvo pridaných makronutričných zásobných roztokov pri príprave médií M4 a M7 (ml/l)	Konečné koncentrácie v testovacích roztokoch M4 a M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Tabuľka 3

Vitamínový zásobný roztok pre médiá M4 a M7. Všetky tri vitamínové roztoky sa skombinujú, aby sa vytvoril jeden vitamínový zásobný roztok.

	Množstvo doplnené do jedného litra deionizovanej vody (mg)	Množstvo pridaného vitamínového zásobného roztoku pri príprave médií M4 a M7 (ml/l)	Konečné koncentrácie v testovacích roztokoch M4 a M7 (mg/l)
Tiamín hydrochlorid	750	0,1	0,075
Kyanokobalamín (B12)	10	0,1	0,0010
Biotín	7,5	0,1	0,00075

LITERATÚRA

Elendt, B. P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25 – 33.

Elendt, B. P., a Bias, W.-R. (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157 – 1167.

▼M4

Dodatok 3

PRÍPRAVA UMELO PRIPRAVENÉHO SEDIMENTU

Zloženie sedimentu

Zloženie umelo pripraveného sedimentu by malo byť takéto:

Zložka	Charakteristika	% suchej hmotnosti sedimentu
Rašelina	Rašelinníková rašelina, pH čo najbližšie k 5,5 – 6,0, bez viditeľných zvyškov rastlín, jemne rozomletá (veľkosť častíc ≤ 1 mm) a usušená vzduchom	4 – 5
Kremenný piesok	Veľkosť zrniek: > 50 % častíc by malo mať veľkosť v rozsahu 50 – 200 µm	75 – 76
Kaolín	Obsah kaolinitu ≥ 30 %	20
Organický uhlík	Upravený pridaním rašeliny a piesku	2 (± 0,5)
Uhličitan vápenatý	$CaCO_3$, rozomletý na prach, chemicky čistý	0,05 - 0,1
Voda	Vodivosť ≤ 10 µS/cm	30 - 50

Príprava

Rašelina sa usuší vzduchom a rozomelie na jemný prášok. V deionizovanej vode sa pomocou vysokovýkonného homogenizačného prístroja pripraví suspenzia požadovaného množstva rašelinového prášku. Hodnota pH tejto suspenzie sa upraví na 5,5 ± 0,5 pomocou $CaCO_3$. Suspenzia sa aspoň na dva dni uvedie do podmienok jemným premiešavaním pri teplote 20 ± 2 °C, aby sa stabilizovala hodnota pH a vytvorila stabilná mikrobiálna zložka. Opäť sa zmeria pH, ktoré by malo byť na úrovni 6,0 ± 0,5. Rašelinová suspenzia sa následne zmieša s ostatnými zložkami (piesok a kaolín) a s deionizovanou vodou, aby sa získal homogénny sediment s obsahom vody v rozsahu 30 - 50 percent suchej hmotnosti sedimentu. Znova sa zmeria hodnota pH konečnej zmesi a podľa potreby sa pomocou $CaCO_3$ upraví na 6,5 – 7,5. Odoberú sa vzorky sedimentu, aby sa určila suchá hmotnosť a obsah organického uhlíka. Následne sa odporúča, aby sa pred použitím v teste toxicity pri pakomároch umelo pripravený sediment uviedol na sedem dní do rovnakých podmienok, aké budú prevládať v nasledujúcom teste.

Skladovanie

Suché zložky na prípravu umelého sedimentu sa môžu skladovať na suchom a chladnom mieste pri izbovej teplote. Umelo pripravený (mokrý) sediment by sa pred použitím v teste nemal skladovať. Mal by sa použiť hneď po sedemdňovom období uvádzania do podmienok, ktorým sa končí jeho príprava.

LITERATÚRA

Kapitola C.8 tejto prílohy. Toxicita pre dážďovky.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10 – 20.

▼M4

Dodatok 4

Chemické charakteristiky prijateľnej riediacej vody

Látka	Koncentrácie
Pevné častice	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Neionizovaný amoniak	< 1 µg/l
Tvrdosť ako $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Zostatkový chlór	< 10 µg/l
Celkové organofosfátové pesticídy	< 50 ng/l
Celkové organochlórované pesticídy plus polychlórované bifenyly	< 50 ng/l
Celkový organický chlór	< 25 ng/l

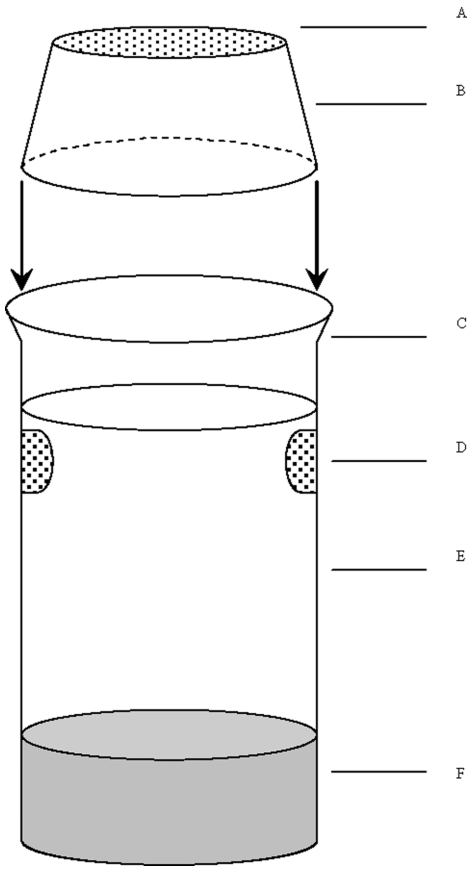
(*) Treba však poznamenať, že ak existuje podozrenie na interakciu medzi iónmi tvrdosti a testovanou látkou, mala by sa použiť voda s nižšou tvrdosťou (a v takom prípade sa teda nesmie použiť Elendtovo médium M4).

▼M4

Dodatok 5

Usmernenie k monitorovaniu vykuklenia lariev pakomárov

Na testovacie kadičky sa umiestnia pasce na vykuklené jedince. Tieto pasce sú potrebné odo dňa 20 do skončenia testu. Ďalej je znázornený príklad použitej pasce.



A: nylonová sieťka

B: prevrátené umelohmotné misky

C: expozičná kadička bez okraja

D: sieťované otvory na výmenu vody

E: voda

F: sediment

▼M4

C. 28. **TEST TOXICITY CHIRONOMIDAE V SYSTÉME SEDIMENT – VODA ZA POUŽITIA OBOHATENEJ VODY**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s OECD TG 219 (2004). Táto testovacia metóda bola vypracovaná s cieľom hodnotiť účinky predĺženého pôsobenia chemikálií na vodné larvy dvojkrídlovcov rodu *Chironomus* žijúce v sedimente. Vychádza najmä z usmernenia BBA, ktoré používa testovací systém sediment – voda s umelou pôdou a expozičným scenárom vo vodnom stĺpci (1). Zohľadňuje aj existujúce protokoly o testoch toxicity na *Chironomus riparius* a *Chironomus tentans*, ktoré boli vypracované v Európe a Severnej Amerike (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) a boli podrobené kruhovým testom (1) (6) (9). Môžu sa použiť aj iné dobre zdokumentované druhy pakomárov, napr. *Chironomus yoshimatsui* (10) (11).

2. Expozičný scenár použitý v tejto testovacej metóde je obohacovanie vody. Výber vhodného expozičného scenára závisí od plánovaného použitia testu. Vodný expozičný scenár zahŕňajúci obohatenie vodného stĺpca je určený na simuláciu prípadu pesticídneho postreku a zahŕňa počiatočné maximálne koncentrácie v pórovej vode. Je užitočný aj pri iných druhoch expozície (vrátane chemických únikov) s výnimkou akumulačných procesov, ktoré trvajú dlhšie ako testovacie obdobie.

3. Látky, ktoré je potrebné testovať na organizmoch žijúcich v sedimente, zvyčajne pretrvajú v tomto kompartmente dlhý čas. Organizmy žijúce v sedimente môžu byť exponované viacerými spôsobmi. Relatívny význam každého spôsobu expozície a časové obdobie, v ktorom sa každý z nich podieľa na celkových toxických účinkoch, závisí od fyzikálno-chemických vlastností danej chemikálie. V prípade silno adsorbujúcich látok (napr. s log K_{ow} > 5) alebo látok, ktoré sa kovalentne viažu na sediment, môže byť významným spôsobom expozície prijímanie kontaminovanej potravy. S cieľom vyhnúť sa podhodnoteniu toxicity vysokolipofilných látok možno zvážiť použitie potravy pridanej do sedimentu pred aplikáciou testovanej látky. S cieľom zohľadniť všetky potenciálne spôsoby expozície sa táto testovacia metóda zameriava na dlhodobú expozíciu. Trvanie testu je v rozsahu 20 – 28 dní v prípade druhov *C. riparius* a *C. yoshimatsui* a 28 – 65 dní pri *C. tentans*. Ak sú na špecifické účely potrebné krátkodobé údaje, napríklad s cieľom skúmať účinky nestabilných chemikálií, môžu sa po desiatich dňoch odstrániť ďalšie replikáty.

4. Meranými parametrami sú celkový počet vykuklených dospelých jedincov a čas do vykuklenia. Ak sú potrebné ďalšie krátkodobé údaje, odporúča sa vykonať merania prežitia a rastu lariev až po desiatich dňoch s použitím ďalších replikátov podľa potreby.

5. Odporúča sa použiť umelo pripravený sediment. Umelo pripravený sediment má oproti prírodným sedimentom niekoľko výhod:

— zníži sa variabilita testu, lebo umelo pripravený sediment vytvára reprodukovateľnú „štandardizovanú matricu“, a odstráni sa potreba nájsť nekontaminované a čisté zdroje sedimentu,

— testy je možné začať kedykoľvek bez problému sezónnej variability v testovanom sedimente a nie je potrebné sediment predpripraviť, aby sa odstránila pôvodná fauna. Použitie umelo pripraveného sedimentu takisto znižuje náklady spojené s odberom dostatočných množstiev sedimentu v teréne na rutinné testovanie,

▼M4

— použitie umelo pripraveného sedimentu umožňuje porovnanie toxicity a následné zatriedenie látok: údaje o toxicite z testov s prírodnými a umelými sedimentmi boli v prípade viacerých chemikálií porovnateľné (2).

6. Vymedzenie pojmov je uvedené v dodatku 1.

PRINCÍP TESTU

7. Larvy pakomárov v prvom instare sú exponované rozsahu koncentrácií testovanej látky v systémoch sediment – voda. Test sa začne umiestnením lariev v prvom instare do testovacích kadičiek obsahujúcich systém sediment – voda a následne obohatením vody testovanou látkou. Na konci testu sa meria vykuklenie pakomárov a vývojový pomer. Podľa potreby sa môže po desiatich dňoch merať aj prežitie a hmotnosť lariev (pomocou ďalších replikátov podľa potreby). Tieto údaje sa analyzujú buď prostredníctvom regresného modelu na odhadnutie koncentrácie, ktorá by spôsobila x % pokles vo vykuklení, prežívaní lariev alebo raste (napr. EC_{15}, EC_{50} atď.), alebo prostredníctvom testovania štatistickej hypotézy na stanovenie koncentrácie NOEC/LOEC. Pri druhom spôsobe je potrebné pomocou štatistických testov porovnať hodnoty účinkov s kontrolnými hodnotami.

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ LÁTKE

8. Je potrebné poznať rozpustnosť testovanej látky vo vode, jej tlak pary, namerané alebo vypočítané delenie na sediment a stabilitu vo vode a v sedimente. Mala by byť k dispozícii spoľahlivá analytická metóda so známou a zdokumentovanou presnosťou a detekčným limitom na kvantifikáciu testovanej látky v nadložnej vode, pórovej vode a sedimente. Medzi užitočné informácie patrí štrukturálny vzorec a čistota testovanej látky. Užitočnou informáciou je aj chemický osud testovanej chemikálie (napr. rozptýlenie, abiotická a biotická degradácia atď.). Ďalšie informácie pre testované látky s fyzikálno-chemickými vlastnosťami, ktoré sťažujú ich testovanie, sú uvedené v odkaze (12).

REFERENČNÉ CHEMIKÁLIE

9. Referenčné chemikálie sa môžu testovať pravidelne ako prostriedok na zabezpečenie spoľahlivosti testovacieho protokolu a testovacích podmienok. Príkladmi referenčných toxických látok, ktoré sa úspešne používajú v kruhových testoch a overovacích štúdiách, sú: lindán, trifluralín, pentachlórfenol, chlorid kademnatý a chlorid draselný (1) (2) (5) (6) (13).

PLATNOSŤ TESTU

10. Aby bol test platný, musí spĺňať tieto podmienky:

— vykuklenie v kontrolných skupinách musí byť na konci testu na úrovni minimálne 70 % (1) (6),

— vykuklenie druhov *C. riparius* a *C. yoshimatsui* na dospelé jedince z kontrolných nádob by malo nastať 12 – 23 dní po ich vložení do nádob. V prípade druhu *C. tentans* je potrebné obdobie 20 – 65 dní,

— na konci testu je potrebné zmerať v každej nádobe pH a koncentráciu rozpusteného kyslíka. Koncentrácia kyslíka by pri použitej teplote mala predstavovať najmenej 60 % saturačnej hodnoty vzduchom (ASV) a hodnota pH nadložnej vody by vo všetkých testovacích nádobách mala byť v rozmedzí 6 – 9,

▼M4

— teplota vody by sa nemala líšiť o viac ako ± 1,0 °C. Teplotu vody je možné kontrolovať pomocou izotermickej komory a v tom prípade je potrebné v primeraných časových intervaloch potvrdiť teplotu v komore.

OPIS METÓDY

Testovacie nádoby

11. Štúdia sa vykonáva v sklenených kadičkách s objemom 600 ml a s priemerom 8 cm. Sú vhodné aj iné nádoby, ale musia zaručiť vhodnú hĺbku nadložnej vody a sedimentu. Povrch sedimentu by mal byť dostatočne veľký, aby poskytoval 2 – 3 cm^2 priestoru na larvu. Pomer hĺbky vrstvy sedimentu k hĺbke nadložnej vody by mal byť 1: 4. Testovacie nádoby a iné prístroje, ktoré prichádzajú do styku s testovacím systémom, by mali byť vyrobené výlučne zo skla alebo iného chemicky inertného materiálu (napr. teflónu).

Výber druhov

12. Uprednostňovaným druhom na použitie v teste je *Chironomus riparius*. *Chironomus tentans* je takisto vhodný, ale je náročnejší na starostlivosť a vyžaduje si dlhšie trvanie testu. Možno použiť aj *Chironomus yoshimatsui*. Podrobné informácie o kultivačných metódach v prípade druhu *Chironomus riparius* sú uvedené v dodatku 2. Informácie o kultivačných podmienkach sú k dispozícii aj pre iné druhy, t. j. *Chironomus tentans* (4) a *Chironomus yoshimatsui* (11). Identifikácia druhov musí byť pred testovaním potvrdená, ale nevyžaduje sa pred každým testom, ak organizmy pochádzajú z internej kultúry.

Sediment

13. Uprednostňuje sa použitie umelo pripraveného sedimentu (známeho aj pod názvom rekonštituovaný, umelý alebo syntetický sediment). Ak sa však použije prírodný sediment, je potrebné ho charakterizovať (aspoň pH, obsah organického uhlíka, odporúča sa aj stanovenie ostatných parametrov ako pomer C/N a granulometria) a nemal by obsahovať žiadne kontaminanty ani iné organizmy, ktoré by mohli s pakomármi súperiť alebo ich požierať. Takisto sa odporúča, aby bol prírodný sediment pred použitím v teste toxicity pri pakomároch na sedem dní uvedený do podmienok, ktoré budú prevládať v nasledujúcom teste. V tomto teste (1) (15) (16) sa odporúča použiť nasledujúci umelo pripravený sediment založený na umelej pôde použitej v testovacej metóde C.8 (14):

a) 4 – 5 % (suchá hmotnosť) rašeliny: čo najbližšie k pH 5,5 – 6,0. Je dôležité použiť rašelinu v práškovej forme, jemne rozomletú (veľkosť častíc ≤ 1 mm) a sušenú iba vzduchom;

b) 20 % (suchá hmotnosť) kaolínu (obsah kaolinitu podľa možnosti nad 30 %);

c) 75 – 76 % (suchá hmotnosť) kremenného piesku (mal by prevládať jemný piesok s viac ako 50 % častíc s veľkosťou od 50 do 200 μm);

d) deionizovaná voda sa pridá, aby sa dosiahla vlhkosť konečnej zmesi v rozsahu 30 – 50 %;

e) uhličitan vápenatý chemicky čistej kvality ($CaCO_3$) sa pridá, aby sa pH konečnej zmesi sedimentu upravila na 7,0 ± 0,5;

f) obsah organického uhlíka v konečnej zmesi by mal byť 2 % (± 0,5 %) a je potrebné ho upraviť pomocou primeraného množstva rašeliny a piesku podľa písmen a) a c).

▼M4

14. Zdroj rašeliny, kaolínu a piesku by mal byť známy. Je potrebné skontrolovať, či zložky sedimentu neobsahujú chemické kontaminanty (napr. ťažké kovy, organochlórové zlúčeniny, organofosforové zlúčeniny atď.). Príklad prípravy umelo pripraveného sedimentu je uvedený v dodatku 3. Miešanie suchých zložiek je takisto prípustné, ak sa preukáže, že po pridaní nadložnej vody nedochádza k separácii zložiek sedimentu (napr. k vyplaveniu častíc rašeliny) a že rašelina alebo sediment sú v dostatočnej miere uvedené do podmienok.

Voda

15. Každá voda, ktorá vyhovuje chemickým charakteristikám prijateľnej riediacej vody podľa zoznamu uvedeného v dodatkoch 2 a 4, je vhodná ako testovacia voda. Každá vhodná voda, prírodná voda (povrchová alebo podzemná voda), rekonštituovaná voda (pozri dodatok 2) alebo odchlórovaná voda z vodovodu sú prijateľné ako voda na kultiváciu a testovacia voda, ak v nej pakomáre prežijú počas celej kultivácie a testovania bez príznakov stresu. Na začiatku testu by pH testovacej vody mala mať hodnotu medzi 6 a 9 a celková tvrdosť by nemala byť vyššia ako 400 mg/l pre $CaCO_3$. Ak však existuje podozrenie na interakciu medzi iónmi tvrdosti a testovanou látkou, mala by sa použiť voda s nižšou tvrdosťou (a v takom prípade sa teda nesmie použiť Elendtovo médium M4). Počas celej štúdie by sa mal používať rovnaký druh vody. Charakteristiky kvality vody uvedené v dodatku 4 by sa mali merať najmenej dvakrát za rok, alebo ak existuje podozrenie, že sa tieto charakteristiky mohli významne zmeniť.

Zásobné roztoky – obohatená voda

16. Testovacie koncentrácie sa vypočítajú na základe koncentrácií vo vodnom stĺpci, t. j. vody nad sedimentom. Testovacie roztoky vybratých koncentrácií sa zvyčajne pripravujú zriedením zásobného roztoku. Zásobné roztoky sa podľa možnosti pripravujú rozpustením testovanej látky v testovacom médiu. V niektorých prípadoch môže byť na vytvorenie vhodne koncentrovaného zásobného roztoku potrebné použiť rozpúšťadlá alebo disperzné činidlá. Príkladmi vhodných rozpúšťadiel sú acetón, etanol, metanol, etylénglykolmonoetyléter, etylénglykoldimetyléter, dimetylformamid a trietylénglykol. Ako disperzné činidlá možno použiť Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % metylcelulózu a HCO-40. Koncentrácia látky zvyšujúcej rozpustnosť v konečnom testovacom médiu by mala byť minimálna (t. j. ≤ 0,1 ml/l) a mala by byť vo všetkých pokusoch rovnaká. Ak sa použije látka zvyšujúca rozpustnosť, nesmie mať žiadne signifikantné účinky na prežívanie ani žiaden viditeľný škodlivý účinok na larvy pakomárov, aké sa preukázali pri kontrole s rozpúšťadlom. Je však potrebné vynaložiť maximálne úsilie, aby sa predišlo použitiu týchto materiálov.

KONCEPCIA TESTU

17. Koncepcia testu sa vzťahuje na výber počtu a odstup testovaných koncentrácií, počet nádob pri každej koncentrácii a počet lariev v každej nádobe. Sú tu opísané koncepcie na odhadnutie bodu EC, na odhadnutie koncentrácie NOEC a na vykonanie limitného testu. Uprednostňuje sa regresná analýza pred testovaním hypotéz.

Koncepcia regresnej analýzy

18. Účinná koncentrácia (napr. EC_{15}, EC_{50}) a koncentračný rozsah, v ktorom sa skúmajú účinky testovanej látky, sa merajú koncentráciami zahrnutými do testu. Vo všeobecnosti sú presnosť a najmä platnosť, s ktorou možno odhadovať účinné koncentrácie (EC_x), lepšie, ak je účinná koncentrácia

▼M4

v rozsahu testovaných koncentrácií. Je potrebné vyhýbať sa extrapolácii hlboko pod najnižšou pozitívnou koncentráciou alebo nad najvyššou koncentráciou. Pri výbere rozsahu koncentrácií, ktoré sa použijú, je užitočný predbežný test na zistenie rozsahu (pozri odsek 27).

19. Ak je potrebné odhadnúť EC_x, malo by sa testovať najmenej päť koncentrácií a tri replikáty pre každú koncentráciu. V každom prípade je vhodné použiť dostatočné testovacie koncentrácie, ktoré umožnia dobrý modelový odhad. Faktor medzi koncentráciami by nemal byť väčší ako 2 (v prípadoch, keď má krivka závislosti reakcie od dávky plytký sklon, možno urobiť výnimku). Počet replikátov pri každej aplikácii sa môže znížiť, ak sa zvýši počet testovacích koncentrácií s rozdielnymi reakciami. Zvýšenie počtu replikátov alebo skrátenie dĺžky intervalov testovacích koncentrácií zvyčajne vedie k nižším intervalom spoľahlivosti testu. Ak sa odhaduje desaťdňové prežívanie a rast lariev, sú potrebné ďalšie replikáty.

Koncepcia odhadu NOEC/LOEC

20. Ak sa odhadujú koncentrácie NOEC/LOEC, použije sa päť testovacích koncentrácií s najmenej štyrmi replikátmi a faktor medzi koncentráciami by nemal byť vyšší ako dva. Počet replikátov by mal byť dostatočný, aby sa zabezpečila primeraná štatistická výpovedná hodnota na zistenie rozdielu 20 % pri kontrole pri úrovni významnosti 5 % ($p = 0,05$). V prípade vývojového pomeru je zvyčajne vhodná analýza rozptylu (ANOVA), ako napríklad Dunnettov test a Williamsov test (17) (18) (19) (20). Pri pomere vykuklenia možno použiť Cochranov-Armitageho, Fisherov exaktný (s Bonferroniho korekciou) alebo Mantelov-Haenszelov test.

Limitný test

21. Môže sa vykonať limitný test (jedna testovaná koncentrácia a kontrola), ak v predbežnom teste na zistenie rozsahu neboli pozorované žiadne účinky. Účelom limitného testu je ukázať, že toxická hodnota testovanej látky je väčšia ako testovaná limitná koncentrácia. V tejto testovacej metóde nemožno navrhnúť odporúčanú koncentráciu. Toto rozhodnutie je na posúdení regulačného orgánu. Zvyčajne je na aplikáciu aj kontrolu potrebných najmenej šesť replikátov. Je nutné preukázať primeranú štatistickú výpovednú hodnotu na zistenie rozdielu 20 % pri kontrole pri úrovni významnosti 5 % ($p = 0,05$). V prípade metrickej reakcie (vývojový pomer a hmotnosť) je vhodnou štatistickou metódou t-test, pokiaľ údaje spĺňajú požiadavky tohto testu (normalita, homogénne rozptyly). Ak tieto požiadavky nie sú splnené, môže sa použiť t-test nerovnomerných rozptylov alebo neparametrický test, ako napríklad Wilcoxonov-Mannov-Whitheyho test. Pri pomere vykuklenia je vhodný Fisherov exaktný test.

POSTUP

Podmienky expozície

Príprava systému obohatená voda – sediment

22. Do testovacích nádob sa pridajú primerané množstvá umelo pripraveného sedimentu (pozri odseky 13 – 14 a dodatok 3), aby sa vytvorila vrstva hrubá najmenej 1,5 cm. Voda sa pridá do výšky 6 cm (pozri odsek 15). Pomer výšky vrstvy sedimentu a výšky vody by nemal presiahnuť 1: 4, pričom vrstva sedimentu by nemala byť hrubšia ako 3 cm. Systém sediment – voda by sa mal pred pridaním testovacích organizmov nechať jemne prevzdušňovať počas siedmich dní (pozri odsek 14 a dodatok 3). S cieľom zabrániť separácii zložiek sedimentu a resuspendovaniu jemného materiálu počas pridávania testovacej vody do vodného stĺpca môže byť sediment v čase, keď sa naň nalieva voda, prikrytý umelohmotným kotúčom, ktorý sa hneď potom odstráni. Môže byť vhodné aj použitie iných prístrojov.

▼M4

23. Testovacie nádoby sa zakryjú (napr. sklenenými platňami). V prípade potreby sa počas štúdie dopĺňajú hladiny vody na pôvodný objem s cieľom kompenzovať vyparovanie vody. Na tento účel sa použije destilovaná alebo deionizovaná voda, aby sa predišlo hromadeniu solí.

Pridanie testovacích organizmov

24. Štyri až päť dní pred pridaním testovacích organizmov do testovacích nádob sa z kultúr odoberú vajíčkové masy a umiestnia sa do malých nádob s kultivačných médiom. Môže sa použiť staršie médium zo zásobnej kultúry alebo čerstvo pripravené médium. Ak sa použije čerstvo pripravené kultivačné médium, je potrebné doň pridať malé množstvo potravy, napr. zelené riasy a/alebo pár kvapiek filtrátu z jemne rozomletej suspenzie vločkového krmiva pre ryby (pozri dodatok 2). Použijú sa iba čerstvo nakladené vajíčkové masy. Larvy sa zvyčajne začnú liahnuť niekoľko dní po nakladení vajíčok (dva až tri dni v prípade druhu *Chironomus riparius* pri teplote 20 °C a jeden až štyri dni v prípade *Chironomus tentans* pri teplote 23 °C a *Chironomus yoshimatsui* pri teplote 25 °C) a rast lariev prebieha v štyroch instaroch, z ktorých každý trvá štyri až osem dní. V teste sa použijú larvy prvého instaru (dva až tri alebo jeden až štyri dni po vyliahnutí). Instar pakomárov je možné skontrolovať podľa šírky hlavového segmentu (6).

25. Larvy 21. instaru sa pomocou tupej pipety náhodne rozdelia do jednotlivých testovacích nádob obsahujúcich obohatený sediment a vodu. Prevzdušňovanie vody je nutné počas pridávania lariev do testovacích nádob prerušiť a musí byť pozastavené počas ďalších 24 hodín po pridaní lariev (pozri odseky 24 a 32). Podľa použitej koncepcie testu (pozri odseky 19 a 20) je počet lariev použitých pri každej koncentrácii najmenej 60 na odhad bodu EC a 80 na stanovenie koncentrácie NOEC.

26. Dvadsaťštyri hodín po pridaní lariev sa do nadložného vodného stĺpca pridá testovaná látka a opäť sa začne s jemným prevzdušňovaním. Pod povrch vody sa pomocou pipety aplikujú malé množstvá roztokov testovanej látky. Nadložná voda sa potom opatrne premieša, aby sa nenarušil sediment.

Testovacie koncentrácie

27. Pri určovaní rozsahu koncentrácií pre konečný test môže byť užitočný test na zistenie rozsahu. Na tento účel sa použije súbor koncentrácií testovanej látky s veľkými odstupmi. S cieľom zabezpečiť rovnakú hustotu povrchu na pakomára, ktorá sa použije pri konečnom teste, sú pakomáre vystavené každej koncentrácii testovanej látky na obdobie, ktoré umožňuje odhad vhodných testovacích koncentrácií, pričom nie sú potrebné žiadne replikáty.

28. Testovacie koncentrácie pre konečný test sa vyberú na základe výsledkov testu na zistenie rozsahu. Je potrebné použiť a vybrať najmenej päť koncentrácií, ako sa uvádza v odsekoch 18 – 20.

Kontroly

29. Súčasťou testu sú kontrolné nádoby bez prítomnosti testovanej látky, ktoré však obsahujú sediment, a primeraný počet replikátov (pozri odseky 19 – 20). Ak sa pri aplikácii testovanej látky použije rozpúšťadlo (pozri odsek 16), je potrebné pridať kontrolu rozpúšťadla v sedimente.

▼M4

Testovací systém

30. Použijú sa statické systémy. Vo výnimočných prípadoch sa môžu použiť semistatické alebo prietokové systémy s prerušovaným alebo nepretržitým obmieňaním nadložnej vody, napríklad ak sú špecifikácie kvality vody nevhodné pre testovacie organizmy alebo ak ovplyvňujú chemickú rovnováhu (napr. úrovne rozpusteného kyslíka príliš klesnú, koncentrácia vylučovaných produktov príliš stúpne alebo sa zo sedimentu lúhujú minerály, čo má vplyv na pH a/alebo tvrdosť vody). Zvyčajne však postačujú a uprednostňujú sa iné metódy zlepšenia kvality nadložnej vody, ako napríklad prevzdušňovanie.

Potrava

31. Je nevyhnutné larvy kŕmiť podľa možnosti každý deň alebo najmenej trikrát do týždňa. V prvých desiatich dňoch je pre mladé larvy podľa všetkého vhodné krmivo pre ryby (suspenzia vo vode alebo jemne rozomletá potrava, napr. Tetra-Min alebo Tetra-Phyll, bližšie informácie pozri v dodatku 2) v dennom množstve 0,25 – 0,5 mg (0,35 – 0,5 mg pre druh *C. yoshimatsui*) na jednu larvu. Pre staršie larvy môže byť potrebné o niečo väčšie množstvo potravy: denné množstvo 0,5 – 1 mg na jednu larvu by malo po zvyšok testu postačovať. Ak sa pozoruje rast hubovitých organizmov alebo ak sa v kontrolných nádobách pozoruje mortalita, prídel potravy by sa mal vo všetkých testovacích a kontrolných nádobách znížiť. Ak nie je možné vznik hubovitých organizmov zastaviť, test je nutné opakovať. Pri testovaní silno adsorbujúcich látok (napr. s log K_{ow} > 5) alebo látok, ktoré sa kovalentne viažu na sediment, sa môže do umelo pripraveného sedimentu pred stabilizačným obdobím pridať množstvo potravy potrebné na zabezpečenie prežitia a prirodzeného rastu organizmov. Na tento účel sa namiesto krmiva pre ryby musí použiť rastlinný materiál, napr. sa môže pridať 0,5 % (suchá hmotnosť) jemne rozomletých listov napr. pŕhľavy dvojdomej (*Urtica dioica*), moruše (*Morus alba*), ďateliny plazivej (*Trifolium repens*), špenátu (*Spinacia oleracea*) alebo iného rastlinného materiálu (*Cerophyl* alebo alfa celulóza).

Podmienky inkubácie

32. Najlepšie po 24 hodinách od pridania lariev sa zabezpečí jemné prevzdušňovanie nadložnej vody v testovacích nádobách a pokračuje v ňom počas celého testu (treba dbať na to, aby koncentrácia rozpusteného kyslíka neklesla pod 60 % ASV). Prevzdušňovanie sa zabezpečí pomocou sklenenej Pasteurovej pipety upevnenej 2 – 3 cm nad vrstvou sedimentu (t. j. jedna alebo niekoľko bublín za sekundu). Ak sa testujú prchavé chemikálie, možno zvážiť, že systém sediment – voda sa nebude prevzdušňovať.

33. Test sa vykonáva pri konštantnej teplote 20 °C (± 2 °C). V prípade druhu *C. tentans* sa odporúča teplota 23 °C a v prípade *C. yoshimatsui* 25 °C (± 2 °C). Použije sa 16-hodinová svetlá fáza, pričom intenzita svetla by mala byť 500 – 1 000 luxov.

Trvanie expozície

34. Expozícia sa začne pridaním lariev do obohatených a kontrolných nádob. Maximálna dĺžka expozície je 28 dní v prípade druhov *C. riparius* a *C. yoshimatsui* a 65 dní v prípade *C. tentans*. Ak sa pakomáre vykuklia skôr, test sa môže ukončiť najskôr päť dní po vykuklení posledného dospelého jedinca v kontrolnej skupine.

POZOROVANIA

Vykuklenie

35. Určí sa čas vývoja a celkový počet úplne vykuklených samčích a samičích pakomárov. Samčeky sa ľahko identifikujú podľa obrvených tykadiel.

▼M4

36. Testovacie nádoby je potrebné pozorovať najmenej trikrát do týždňa s cieľom vizuálne zhodnotiť každé abnormálne správanie (napr. opúšťanie sedimentu, nezvyčajné plávanie) v porovnaní s kontrolnou skupinou. Počas obdobia očakávaného vykuklenia je nevyhnutné každý deň spočítať vykuklené pakomáre. Pohlavie a počet úplne vykuklených pakomárov sa zaznamenáva denne. Po identifikácii sa pakomáre vyberú z nádob. Všetky vajíčkové masy nakladené pred ukončením testu sa zaznamenajú a následne odstránia, aby sa predišlo opätovnému zavedeniu lariev do sedimentu. Takisto sa zaznamená počet viditeľných kukiel, ktoré sa nevykuklili. Usmernenie k meraniu vykuklenia je uvedené v dodatku 5.

Rast a prežívanie

37. Ak je potrebné získať údaje o desaťdňovom prežívaní a raste lariev, na začiatku sa pripravia ďalšie testovacie nádoby tak, aby sa mohli následne použiť. Sediment z týchto ďalších nádob sa precedí pomocou cedidla s hrúbkou 250 μm, aby sa zachytili larvy. Kritériami na stanovenie smrti sú nehybnosť alebo chýbajúca reakcia na mechanický podnet. Stratené larvy sa takisto počítajú medzi mŕtve (larvy, ktoré uhynuli na začiatku testu, sa mohli rozložiť pôsobením mikróbov). Určí sa suchá hmotnosť (bez popola) lariev, ktoré prežili v každej testovacej nádobe, a vypočíta sa stredná suchá hmotnosť jedincov na jednu nádobu. Je užitočné určiť, do ktorého instaru patria larvy, ktoré prežili. Na toto meranie sa môže použiť šírka hlavového segmentu každého jedinca.

Analytické merania

Koncentrácia testovanej látky

38. Vzorky nadložnej vody, pórovej vody a sedimentu sa musia analyzovať minimálne na začiatku (najlepšie jednu hodinu po aplikácii testovanej látky) a na konci testu pri najvyššej koncentrácii a pri jednej nižšej koncentrácii. Tieto skúmania koncentrácie testovanej látky poskytujú informácie o správaní/delení testovanej látky v systéme voda – sediment. Odoberanie vzoriek na začiatku testu môže ovplyvniť testovací systém (napr. odstránenie testovaných lariev), preto je potrebné použiť ďalšie testovacie nádoby, aby bolo podľa potreby možné vykonať analytické vyšetrenia na začiatku a počas testu (pozri odsek 39). Merania v sedimente nemusia byť potrebné, ak sa delenie testovanej látky medzi vodu a sediment jednoznačne určilo v štúdii voda/sediment pri porovnateľných podmienkach (napr. pomer sedimentu k vode, druh aplikácie, obsah organického uhlíka v sedimente).

39. Ak sa vykonajú prostredné merania (napr. v deň 7) a ak sú na analýzu potrebné veľké vzorky, ktoré nemožno odobrať z testovacích nádob bez ovplyvnenia testovacieho systému, analytické vyšetrenia je potrebné vykonať na vzorkách z ďalších testovacích nádob, s ktorými sa zaobchádzalo rovnakým spôsobom (vrátane prítomnosti testovacích organizmov), ale ktoré sa nepoužijú na biologické pozorovania.

40. Na izolovanie intersticiálnej vody je odporúčaným postupom odstredenie napr. pri 10 000 g a 4 °C počas 30 minút. Ak sa však preukáže, že testovaná látka sa na filtroch neadsorbuje, môže byť prijateľná aj filtrácia. V niektorých prípadoch nemusí byť možné analyzovať koncentrácie v pórovej vode, lebo vzorka je príliš malá.

▼M4

Fyzikálno-chemické parametre

41. Je potrebné vhodným spôsobom odmerať pH, rozpustený kyslík v testovacej vode a teplotu v testovacích nádobách (pozri odsek 10). Tvrdosť a amoniak sa merajú v kontrolných nádobách a v jednej testovacej nádobe pri najvyššej koncentrácii na začiatku a na konci testu.

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

42. Účelom tohto testu je určiť účinok testovanej látky na vývojový pomer a celkový počet úplne vykuklených samčích a samičích pakomárov, alebo v prípade desaťdňového testu účinky na prežívanie a hmotnosť lariev. Ak nič nepoukazuje na štatisticky rozdielnu vnímavosť medzi pohlaviami, výsledky pre samčeky a samičky možno na účely štatistických analýz zhrnúť spoločne. Rozdiely vnímavosti medzi pohlaviami sa môžu štatisticky posúdiť, napr. tabuľkovým testom $\chi^2 - r \times 2$. Prežívanie lariev a stredná suchá hmotnosť jedincov na jednu nádobu sa podľa potreby musí určiť po desiatich dňoch.

43. Účinné koncentrácie vyjadrené ako koncentrácie v nadložnej vode sa podľa možnosti vypočítajú na základe nameraných koncentrácií na začiatku testu (pozri odsek 38).

44. Na vyčíslenie odhadu bodu EC_{50} alebo akejkoľvek inej hodnoty EC_x sa ako pravé replikáty môže použiť štatistika na jednu nádobu. Pri výpočte intervalu spoľahlivosti pre každú hodnotu EC_x je potrebné zohľadniť variabilitu medzi nádobami alebo je nutné preukázať, že táto variabilita je taká malá, že je možné ju ignorovať. Ak sa model upraví metódou najmenších štvorcov, v štatistike na jednu nádobu je potrebné aplikovať transformáciu, aby sa zlepšila homogénnosť rozptylu. Hodnoty EC_x by sa však mali vypočítať po tom, ako sa reakcia transformuje naspäť na pôvodnú hodnotu.

45. Ak je cieľom štatistickej analýzy určenie koncentrácie NOEC/LOEC prostredníctvom testovania hypotézy, je potrebné zohľadniť variabilitu medzi nádobami, napr. pomocou hierarchickej analýzy ANOVA. Alternatívne môžu byť vhodné podrobnejšie testy (21) v prípadoch, keď dochádza k nedodržaniu zvyčajných predpokladov analýzy ANOVA.

Pomer vykuklenia

46. Pomery vykuklenia sú kvantové údaje a môžu sa analyzovať pomocou Cochranovho-Armitageho testu aplikovaného zostupne v prípadoch, keď sa očakáva monotónna reakcia na dávku a tieto údaje zodpovedajú tomuto očakávaniu. Ak tomu tak nie je, možno použiť Fisherov exaktný test alebo Mantzelov-Haentzalov test s Bonferroniho-Holmovou úpravou hodnôt p. Ak sa medzi replikátmi pri rovnakej koncentrácii preukáže väčšia variabilita, než akú by indikovala binomická distribúcia (často sa uvádza ako „extrabinomická“ variácia), potom by sa mal použiť podrobný Cochranov-Armitageho test alebo Fisherov exaktný test, ako sa navrhuje v bode (21).

47. Určí sa súčet pakomárov vykuklených na jednu nádobu, ne, a vydelí sa počtom zavedených lariev, na:

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼M4

kde:

ER = pomer vykuklenia,

n_e = počet pakomárov vykuklených na nádobu,

n_a = počet zavedených lariev na nádobu.

48. Najvhodnejšou alternatívou pri veľkých vzorkách v prípadoch extra binomickej variácie je brať pomer vykuklenia (ER) ako nepretržitú reakciu a použiť postupy, ako je napríklad Williamsov test, ak sa očakáva monotónna reakcia na dávku, ktorá je konzistentná s týmito údajmi o ER. Ak reakcia nie je monotónna, je vhodný Dunnettov test. Za veľkú vzorku sa pokladá vzorka, v ktorej je počet vykuklených aj počet nevykuklených jedincov v každom replikáte (nádobe) vyšší ako päť.

49. Pri aplikovaní metód ANOVA je potrebné najskôr transformovať hodnoty ER pomocou arkussínusovej transformácie druhej odmocniny alebo Freemanovej-Tukeyho transformácie s cieľom získať približnú normálnu distribúciu a vyrovnať rozptyly. Cochranov-Armitageho test, Fisherov exaktný (Bonferroniho) test alebo Mantelov-Haenszelov test možno aplikovať, ak sa použijú absolútne frekvencie. Arkussínusová transformácia druhej odmocniny sa aplikuje pomocou prevrátenej hodnoty sínusu ($\sin^{-1}$) druhej odmocniny ER.

50. Pri pomeroch vykuklenia sa hodnoty EC_x vypočítajú pomocou regresnej analýzy (alebo napr. pomocou modelov probit (22), logit, Weibull, vhodného komerčného softvéru atď.). Ak je regresná analýza neúspešná (napr. ak sú k dispozícii menej ako dve čiastkové reakcie), použijú sa iné neparametrické metódy, ako je metóda pohyblivého priemeru alebo jednoduchá interpolácia.

Vývojový pomer

51. Stredný vývojový čas predstavuje stredné časové rozpätie medzi zavedením lariev (deň 0 testu) a vykuklením pokusnej kohorty pakomárov. (Pri výpočte reálneho vývojového času sa zohľadní vek lariev v čase zavedenia). Vývojový pomer je prevrátená hodnota vývojového času (jednotka: 1/deň) a predstavuje časť vývinu lariev, ktorá prebieha za deň. Pri hodnotení týchto štúdií toxicity v sedimente sa uprednostňuje vývojový pomer, lebo jeho rozptyl je nižší a v porovnaní s vývojovým časom je homogénnejší a bližší normálnej distribúcii. Výkonné parametrické testovacie postupy teda možno lepšie použiť s vývojovým pomerom ako s vývojovým časom. Pre vývojový pomer ako nepretržitú reakciu možno hodnoty EC_x odhadnúť pomocou regresnej analýzy [napr. (23) (24)].

52. Pri nasledujúcich štatistických testoch sa predpokladá, že počet pakomárov pozorovaných v kontrolnom dni × sa vykuklil v strednom časovom intervale medzi dňom × a dňom x - l (l = dĺžka kontrolného intervalu, zvyčajne jeden deň). Stredný vývojový pomer na nádobu *x*) sa vypočíta podľa tejto rovnice:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

kde:

$\bar{x}$: stredný vývojový pomer na nádobu,

i: index kontrolného intervalu,

m: maximálny počet kontrolných intervalov,

▼M4

f_i: počet pakomárov vykuklených v kontrolnom intervale i,

n_e: celkový počet pakomárov vykuklených na konci pokusu (= $\sum f_i$),

x_i: vývojový pomer pakomárov vykuklených v intervale i;

$$x_i = 1/\left(day_i - \frac{l_i}{2}\right)$$

kde:

$deň_i$: kontrolný deň (dni od aplikácie),

l_i: dĺžka kontrolného intervalu i (dni, zvyčajne jeden deň).

Správa o teste

53. Správa o teste musí obsahovať aspoň tieto informácie:

Testovaná látka:

— fyzikálny charakter a, ak je to relevantné, fyzikálno-chemické vlastnosti (rozpustnosť vo vode, tlak pary, rozdeľovací koeficient v pôde (alebo v sedimente, ak je k dispozícii), stabilita vo vode atď.),

— chemické identifikačné údaje (bežný názov, chemický názov, štruktúrálny vzorec, číslo CAS atď.) vrátane čistoty a analytickej metódy kvantifikácie testovanej látky.

Testovacie druhy:

— použité testovacie zvieratá: druh, vedecký názov, zdroj organizmov a podmienky chovu,

— informácie o manipulácii s vajíčkovými masami a larvami,

— vek testovacích zvierat pri umiestnení do testovacích nádob.

Podmienky testovania:

— použitý sediment, t. j. prírodný alebo umelo pripravený sediment,

— v prípade prírodného sedimentu poloha a opis miesta odobratia vzoriek sedimentu vrátane histórie kontaminácie, ak je to možné, charakteristiky: pH, obsah organického uhlíka, pomer C/N a granulometria (podľa potreby),

— príprava umelo pripraveného sedimentu: zložky a charakteristiky (obsah organického uhlíka, pH, vlhkosť atď. na začiatku testu),

— príprava testovacej vody (ak sa použije rekonštituovaná voda) a charakteristiky (koncentrácia kyslíka, pH, vodivosť, tvrdosť atď. na začiatku testu),

— výška sedimentu a nadložnej vody,

— objem nadložnej a pórovej vody, hmotnosť mokrého sedimentu s pórovou vodou a bez nej,

— testovacie nádoby (materiál a veľkosť),

— metóda prípravy zásobných roztokov a testovacích koncentrácií,

▼M4

— aplikácia testovanej látky: použité testovacie koncentrácie, počet replikátov a prípadné použitie rozpúšťadiel,

— inkubačné podmienky: teplota, svetelný cyklus a intenzita, prevdzušňovanie (frekvencia a intenzita),

— podrobné informácie o kŕmení vrátane druhu potravy, prípravy, množstva a kŕmneho režimu.

Výsledky:

— nominálne testovacie koncentrácie, namerané testovacie koncentrácie a výsledky všetkých analýz na stanovenie koncentrácie testovanej látky v testovacej nádobe,

— kvalita vody v testovacích nádobách, t. j. pH, teplota, rozpustený kyslík, tvrdosť a amoniak,

— kompenzácia prípadnej vyparenej testovacej vody,

— počet vykuklených samčích a samičích pakomárov na nádobu na deň,

— počet lariev na nádobu, ktoré sa nevykuklili,

— stredná suchá hmotnosť jednotlivých lariev na nádobu a na instar podľa potreby,

— percentuálne vykuklenie na replikát a testovaciu koncentráciu (samčie a samičie pakomáre spolu),

— stredný vývojový pomer úplne vykuklených pakomárov na replikát a miera ošetrenia (samčie a samičie pakomáre spolu),

— odhady toxických parametrov, napr. EC_x (a súvisiace intervaly spoľahlivosti), NOEC a/alebo LOEC a štatistické metódy použité na ich stanovenie,

— rozbor výsledkov vrátane každého vplyvu na výsledok testu vyplývajúceho z odchýlok od tejto testovacej metódy.

LITERATÚRA

1. BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Upravili M. Streloke a H. Köpp. Berlín 1995.

2. Fleming, R. a kol. (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Záverečná správa pre Európsku komisiu. Správa č.: EK, 3738. August 1994. WRc, UK.

3. SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. Zo seminára WOSTA, ktorý sa uskutočnil v Holandsku.

4. ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, s. 1125 – 1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.

5. Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

6. US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Druhé vydanie. EPA 600/R-99/064. Marec 2000. Revízia prvého vydania z júna 1994.

▼**M4**

7. US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.

8. US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.

9. Milani, D., Day, K. E., McLeay, D. J., Kirby, R. S. (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods *(Hyalella azteca)* and midge larvae *(Chironomus riparius)*. Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Kanada.

10. Sugaya, Y. (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides *in Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345 – 350.

11. Kawai, K. (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. Culture methods of some Japanese Chironomids (Chironomidae, Diptera). Jp. J. Sanit. Zool. 37(1): 47 – 57.

12. OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Environment, Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No. 23.

13. Environment Canada (1995). Guidance Document on Measurement of Toxicity Test Precision Using Control Sediments Spiked with a Reference Toxicant. Report EPS 1/RM/30. September 1995.

14. Kapitola C.8 tejto prílohy, Toxicita pre dážďovky.

15. Suedel, B. C., a Rodgers, J. H. (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163 – 1175.

16. Naylor, C., a Rodrigues, C. (1995). Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291 – 3303.

17. Dunnett, C. W. (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc. 50: 1096 – 1121.

18. Dunnett, C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482 – 491.

19. Williams, D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103 – 117.

20. Williams, D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510 – 531.

21. Rao, J. N. K., a Scott, A. J. (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577 – 585.

22. Christensen, E. R. (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213 – 221.

23. Bruce a Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485 – 1494.

24. Slob, W. (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298 – 312.

▼**M4**

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Na účely tejto metódy sa používajú tieto vymedzenia pojmov:

Umelo pripravený sediment alebo rekonštituovaný, umelý alebo syntetický sediment je zmes materiálov použitých na napodobnenie fyzických zložiek prírodného sedimentu.

Nadložná voda je voda umiestnená v testovacej nádobe nad sedimentom.

Intersticiálna voda alebo pórová voda je voda nachádzajúca sa v priestore medzi časticami sedimentu a pôdy.

Obohatená voda je voda, do ktorej bola pridaná testovaná látka.

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

▼M4

Dodatok 2

Odporúčania ku kultúre *Chironomus riparius*

1. Larvy rodu *Chironomus* sa môžu chovať v kryštalizačných miskách alebo vo väčších nádobách. Na dno nádoby sa nanesie tenká vrstva jemného kremenného piesku vo výške 5 – 10 mm. Je preukázané, že vhodným substrátom je aj diatomit (napr. Merck, článok 8117) (postačuje tenšia vrstva do výšky len niekoľkých milimetrov). Potom sa pridá vhodná voda do výšky niekoľkých centimetrov. Hladiny vody by sa mali podľa potreby dopĺňať, aby sa kompenzovala strata vyparením a aby sa predišlo vysychaniu. Vodu je možné v prípade potreby vymeniť. Je potrebné zabezpečiť jemné prevzdušňovanie. Misky na chov lariev by mali byť umiestnené vo vhodnej klietke, ktorá zabráni úniku vykuklených dospelých jedincov. Klietka by mala byť dostatočne veľká, aby umožňovala rojenie vykuklených dospelých jedincov, v opačnom prípade by nemuselo dôjsť ku kopulácii (minimálna veľkosť je asi 30 × 30 × 30 cm).

2. Klietky je potrebné udržiavať pri izbovej teplote alebo v miestnosti so stálym prostredím pri teplote 20 ± 2 °C so svetlou fázou v trvaní 16 hodín (intenzita asi 1 000 luxov) a fázou tmy v trvaní osem hodín. Je preukázané, že vlhkosť vzduchu nižšia ako 60 % RH môže brániť reprodukcii.

Riediaca voda

3. Možno použiť akúkoľvek vhodnú prírodnú alebo syntetickú vodu. Bežne sa používa studňová voda, odchlórovaná voda z vodovodu a umelé médiá (napr. Elendtovo médium „M4“ alebo „M7“, pozri ďalej). Pred použitím je potrebné vodu prevzdušniť. V prípade potreby možno kultivačnú vodu obnoviť opatrným odliatím alebo odčerpaním použitej vody z kultivačných nádob bez toho, aby sa poškodili trubice lariev.

Kŕmenie lariev

4. Larvy rodu *Chironomus* sa kŕmia vločkovým krmivom pre ryby [Tetra Min®, Tetra Phyll® alebo inou podobnou značkou patentovaného krmiva pre ryby] približným množstvom 250 mg na nádobu na deň. Krmivo sa môže podávať ako suchý rozomletý prášok alebo ako suspenzia vo vode: 1,0 g vločkového krmiva sa pridá do 20 ml riediacej vody a premieša sa, aby sa získala homogénna zmes. Tento prípravok sa môže podávať v množstve približne 5ml na nádobu na deň (pred použitím pretrepať). Staršie larvy môžu dostávať viac.

5. Kŕmenie sa upraví podľa kvality vody. Ak sa kultivačné médium zakalí, kŕmenie je potrebné obmedziť. Prídavky do krmiva sa musia starostlivo monitorovať. Nedostatok potravy spôsobí, že larvy sa budú presúvať k vodnému stĺpcu, a prebytok potravy spôsobí zvýšenie činnosti mikróbov a zníženie koncentrácií kyslíka. V obidvoch prípadoch môže dôjsť k zníženiu rastových pomerov.

6. Pri založení nových kultivačných nádob sa môžu pridať aj bunky niektorých zelených rias (napr. *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*).

Kŕmenie vykuklených dospelých jedincov

7. Z niektorých pokusov vyplýva, že ako potrava pre vykuklené dospelé jedince môže slúžiť vatový tampón napustený nasýteným sacharózovým roztokom.

▼M4

Vykuklenie

8. Pri teplote 20 ± 2 °C sa dospelé jedince začnú kukliť z nádoby na chov lariev po približne 13 – 15 dňoch. Samčeky sa ľahko rozlíšia podľa obrvených tykadiel.

Vajíčkové masy

9. Keď sú v chovnej klietke prítomné dospelé jedince, vo všetkých nádobách na chov lariev je potrebné trikrát do týždňa kontrolovať kladenie želatínových vajíčkových más. Ak sú vajíčkové masy prítomné, opatrne sa odoberú. Mali by sa preniesť na malú misku so vzorkou kultivačnej vody. Vajíčkové masy sa použijú na založenie nových kultivačných nádob (napr. dve až štyri vajíčkové masy na nádobu) alebo sa použijú v testoch toxicity.

10. Larvy prvého instaru by sa mali vyliahnuť po dvoch až troch dňoch.

Založenie nových kultivačných nádob

11. Po vytvorení kultúr by malo byť možné založiť novú nádobu na kultiváciu lariev každý týždeň alebo menej často v závislosti od testovacích požiadaviek, pričom staršie nádoby sa po vykuklení dospelých pakomárov odstránia. Týmto spôsobom sa pri minimálnom riadení zabezpečí pravidelné dopĺňanie dospelých jedincov.

Príprava testovacích roztokov „M4“ a „M7“

12. Elendt (1990) opísal médium „M4“. Médium „M7“ sa pripravuje ako médium „M4“ s výnimkou látok označených v tabuľke 1, pre ktoré sú koncentrácie v médiu „M7“ štyrikrát nižšie ako v médiu „M4“. Publikácia o médiu „M7“ je v štádiu prípravy (Elendt, osobná komunikácia). Testovací roztok by sa nemal pripraviť podľa Elendta a Biasa (1990), lebo koncentrácie $NaSiO_3.5H_2O$, $NaNO_3$, KH_2PO_4 a K_2HPO_4 uvedené pre prípravu zásobných roztokov nie sú vhodné.

Príprava média „M7“

13. Každý zásobný roztok (I) sa pripraví jednotlivo a kombinovaný zásobný roztok (II) sa pripraví z týchto zásobných roztokov (I) (pozri tabuľku 1). Na prípravu média „M7“ sa 50 ml z kombinovaného zásobného roztoku (II) a množstvá každého makronutričného zásobného roztoku uvedené v tabuľke 2 doplnia do 1 l deionizovanej vody. Vitamínový zásobný roztok sa pripraví pridaním troch vitamínov do deionizovanej vody, ako je uvedené v tabuľke 3, a krátko pred použitím sa do konečného média „M7“ pridá 0,1 ml kombinovaného vitamínového zásobného roztoku. (Vitamínový zásobný roztok sa skladuje zmrazený v malých alikvotných častiach). Médium sa prevzdušňuje a stabilizuje.

Tabuľka 1

Zásobné roztoky stopových prvkov pre médiá M4 a M7

Zásobné roztoky (I)	Množstvo (mg) doplnené do jedného litra deionizovanej vody	Na prípravu kombinovaného zásobného roztoku (II) sa zmiešajú tieto množstvá (ml) zásobných roztokov (I) a doplnia sa do jedného litra deionizovanej vody		Konečné koncentrácie v testovacích roztokoch (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 [1]	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$MnCl_2 \cdot 4\ H_2O$ [1]	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl [1]	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼**M4**

Zásobné roztoky (I)	Množstvo (mg) doplnené do jedného litra deionizovanej vody	Na prípravu kombinovaného zásobného roztoku (II) sa zmiešajú tieto množstvá (ml) zásobných roztokov (I) a doplnia sa do jedného litra deionizovanej vody		Konečné koncentrácie v testovacích roztokoch (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl (1)	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$SrCl_2 \cdot 6\ H_2O$ (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$ (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$ (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
$ZnCl_2$	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$CaCl_2 \cdot 6\ H_2O$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$Na_2EDTA \cdot 2\ H_2O$ (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$ (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Tieto látky sa líšia v M4 a M7, ako je uvedené vyššie.
(2) Tieto roztoky sa pripravia jednotlivo, potom sa zlejú dokopy a okamžite sa autoklávujú.

Tabuľka 2

Makronutričné zásobné roztoky pre médiá M4 a M7

	Množstvo doplnené do jedného litra deionizovanej vody (mg)	Množstvo pridaných makronutričných zásobných roztokov pri príprave médií M4 a M7 (ml/l)	Konečné koncentrácie v testovacích roztokoch M4 a M7 (mg/l)
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	293 800	1,0	293,8
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
$NaHCO_3$	64 800	1,0	64,8
$NaSiO_3 \cdot 9\ H_2O$	50 000	0,2	10,0
$NaNO_3$	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

▼**M4**

Tabuľka 3

Vitamínový zásobný roztok pre médiá M4 a M7

Všetky tri vitamínové roztoky sa skombinujú, aby sa vytvoril jeden vitamínový zásobný roztok.

	Množstvo doplnené do jedného litra deionizovanej vody (mg)	Množstvo pridaného vitamínového zásobného roztoku pri príprave médií M4 a M7 (ml/l)	Konečné koncentrácie v testovacích roztokoch M4 a M7 (mg/l)
Tiamín hydrochlorid	750	0,1	0,075
Kyanokobalamín (B12)	10	0,1	0,0010
Biotín	7,5	0,1	0,00075

LITERATÚRA

BBA (1995). Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system. Upravili M. Streloke a H.Köpp. Berlín 1995.

Elendt, B. P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25 – 33.

Elendt, B. P., a Bias, W.-R. (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* Cultured in Standard Medium for Toxicity Testing. Effects on the Optimization of Culture Conditions on Life History Parameters of *D. magna*. *Water Research* 24 (9): 1157 – 1167.

▼M4

Dodatok 3

PRÍPRAVA UMELO PRIPRAVENÉHO SEDIMENTU

Zloženie sedimentu

Zloženie umelo pripraveného sedimentu by malo byť takéto:

Zložka	Charakteristika	% suchej hmotnosti sedimentu
Rašelina	Rašelinníková rašelina, pH čo najbližšie k 5,5 – 6,0, bez viditeľných zvyškov rastlín, jemne rozomletá (veľkosť častíc ≤ 1 mm) a usušená vzduchom	4 – 5
Kremenný piesok	Veľkosť zrniek: > 50 % častíc by malo mať veľkosť v rozsahu 50 – 200 µm	75 – 76
Kaolín	Obsah kaolinitu ≥ 30 %	20
Organický uhlík	Upravený pridaním rašeliny a piesku	2 (± 0,5)
Uhličitan vápenatý	$CaCO_3$, rozomletý na prach, chemicky čistý	0,05 – 0,1
Voda	Vodivosť ≤ 10 µS/cm	30 – 50

Príprava

Rašelina sa usuší vzduchom a rozomelie na jemný prášok. V deionizovanej vode sa pomocou vysokovýkonného homogenizačného prístroja pripraví suspenzia požadovaného množstva rašelinového prášku. Hodnota pH tejto suspenzie sa upraví na 5,5 ± 0,5 pomocou $CaCO_3$. Suspenzia sa aspoň na dva dni uvedie do podmienok jemným premiešavaním pri teplote 20 ± 2 °C, aby sa stabilizovala hodnota pH a vytvorila stabilná mikrobiálna zložka. Opäť sa zmeria pH, ktoré by malo byť na úrovni 6,0 ± 0,5. Rašelinová suspenzia sa následne zmieša s ostatnými zložkami (piesok a kaolín) a s deionizovanou vodou, aby sa získal homogénny sediment s obsahom vody v rozsahu 30 – 50 percent suchej hmotnosti sedimentu. Znova sa zmeria hodnota pH konečnej zmesi a podľa potreby sa pomocou $CaCO_3$ upraví na 6,5 – 7,5. Odoberú sa vzorky sedimentu, aby sa určila suchá hmotnosť a obsah organického uhlíka. Následne sa odporúča, aby sa pred použitím v teste toxicity pri pakomároch umelo pripravený sediment uviedol na sedem dní do rovnakých podmienok, aké budú prevládať v nasledujúcom teste.

Skladovanie

Suché zložky na prípravu umelého sedimentu sa môžu skladovať na suchom a chladnom mieste pri izbovej teplote. Umelo pripravený (mokrý) sediment by sa pred použitím v teste nemal skladovať. Mal by sa použiť hneď po sedemdňovom období uvádzania do podmienok, ktorým sa končí jeho príprava.

LITERATÚRA:

Kapitola C.8 tejto prílohy. Toxicita pre dážďovky.

Meller M., Egeler P., Rombke J., Schallnass H., Nagel R., Streit B. (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (Oligochaeta) in Artificial Media. Ecotox. and Environ. Safety 39: 10 – 20.

▼**M4**

Dodatok 4

Chemické charakteristiky prijateľnej riediacej vody

Látka	Koncentrácie
Pevné častice	< 20 mg/l
Celkový organický uhlík	< 2 mg/l
Neionizovaný amoniak	< 1 µg/l
Tvrdosť ako $CaCO_3$	< 400 mg/l (*)
Zostatkový chlór	< 10 µg/l
Celkové organofosfátové pesticídy	< 50 ng/l
Celkové organochlórované pesticídy plus polychlórované bifenyly	< 50 ng/l
Celkový organický chlór	< 25 ng/l

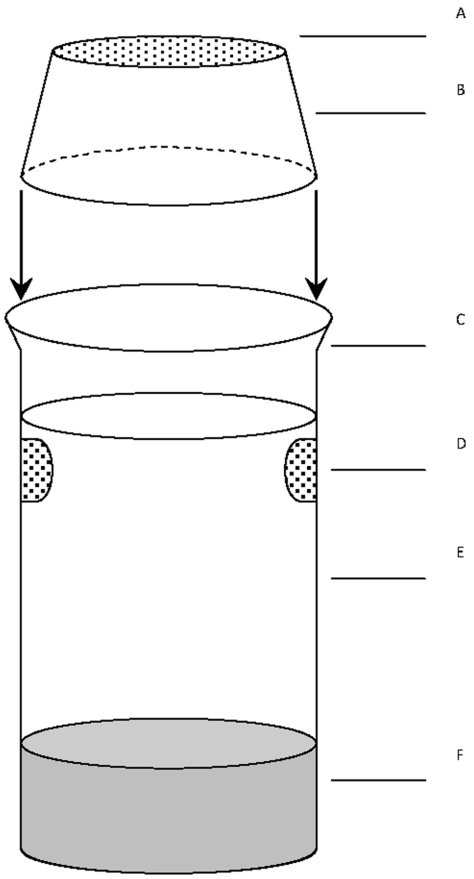
(*) Treba však poznamenať, že ak existuje podozrenie na interakciu medzi iónmi tvrdosti a testovanou látkou, mala by sa použiť voda s nižšou tvrdosťou (a v takom prípade sa teda nesmie použiť Elendtovo médium M4).

▼M4

Dodatok 5

Usmernenie k monitorovaniu vykuklenia lariev pakomárov

Na testovacie kadičky sa umiestnia pasce na vykuklené jedince. Tieto pasce sú potrebné odo dňa 20 do skončenia testu. Ďalej je znázornený príklad použitej pasce.



A: nylonová sieťka

B: prevrátené umelohmotné misky

C: expozičná kadička bez okraja

D: sieťované otvory na výmenu vody

E: voda

F: sediment

▼M4

C.29. ĽAHKÁ BIODEGRADOVATEĽNOSŤ – CO_2 V HERMETICKY UZAVRETÝCH NÁDOBÁCH (TEST V UZAVRETOM PRIESTORE NAD KVAPALINOU)

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s Usmerneniami OECD na vykonávanie testov (TG) 310 (2003). Táto testovacia metóda je skríningovou metódou na hodnotenie ľahkej biodegradovateľnosti chemikálií a poskytuje podobné informácie ako šesť testovacích metód opísaných v kapitole C.4 tejto prílohy A až F. Chemikáliu, pri ktorej sa v tejto testovacej metóde preukážu pozitívne výsledky, možno preto považovať za ľahko biodegradovateľnú, a teda za rýchlo degradovateľnú v životnom prostredí.

2. Zvyčajne bola prvou voľbou na testovanie slabo rozpustných chemikálií a chemikálií, ktoré silne adsorbujú, osvedčená metóda (1) oxidu uhličitého (CO_2) založená na Sturmovom pôvodnom teste (2) na hodnotenie biodegradovateľnosti organických chemikálií meraním oxidu uhličitého vytváraného mikrobiálnym pôsobením. Vyberá sa aj v prípade rozpustných (ale nie prchavých) chemikálií, lebo uvoľňovanie oxidu uhličitého mnohí považujú za jediný jednoznačný dôkaz mikrobiálnej činnosti. Rozpustený organický uhlík možno odstrániť fyzikálno-chemickými procesmi (adsorpciou, vyparením, zrážaním, hydrolýzou), ako aj mikrobiálnym pôsobením, pričom mnohé nebiologické reakcie spotrebúvajú kyslík. V zriedkavých prípadoch sa CO_2 z organických chemikálií tvorí abioticky. V pôvodnom a modifikovanom Sturmovom teste (1) (2) sa CO_2 odstráni z tekutej fázy do absorbujúcich nádob čerením (t. j. bublajúcim vzduchom aplikovaným s cieľom odstrániť CO_2 cez tekuté médium), zatiaľ čo v Larsonovej verzii (3) (4) sa CO_2 prevedie z reakčnej nádoby do absorbérov púšťaním vzduchu bez obsahu CO_2 cez uzavretý priestor nad kvapalinou a ďalej nepretržitým pretrepávaním testovacej nádoby. Reakčná nádoba sa pretrepáva iba v Larsonovej modifikácii. Premiešavanie je v ISO 9439 (5) a v pôvodnej americkej verzii (6) špecifikované iba pre nerozpustné látky, pričom obe normy špecifikujú skôr čerenie namiesto výmeny uzavretého priestoru nad kvapalinou. V ďalšej oficiálnej metóde USA EPA (7) založenej na Gledhillovej metóde (8) sa pretrepávaná reakčná nádoba uzavrie pred ovzduším a vyprodukované CO_2 sa hromadí vo vnútornom alkalickom zachytávači priamo z plynnej fázy podobne ako v prípade klasických Warburgových/Barcroftových respirometrických baniek.

3. Ukázalo sa však, že počas aplikácie štandardného modifikovaného Sturmovho testu na viaceré chemikálie sa v médiu hromadí anorganický uhlík (IC) (9). Počas degradácie 20 mg C/l anilínu bola zistená koncentrácia IC až 8 mg/l. Hromadenie CO_2 v alkalických zachytávačoch preto nezodpovedalo reálnemu množstvu mikrobiologicky vyprodukovaného CO_2 v medzičasoch počas degradácie. Špecifikácia, podľa ktorej na to, aby sa testovaná chemikália klasifikovala ako ľahko biodegradovaná, sa musí počas „desaťdňového okna“ (desať dní nasledujúcich ihneď po dosiahnutí 10 % biodegradácie) nahromadiť > 60 % teoretickej maximálnej produkcie CO_2 ($ThCO_2$), nebude splnená v prípade niektorých chemikálií, ktoré by takto boli klasifikované po použití eliminácie rozpusteného organického uhlíka (DOC).

4. Ak je percentuálna degradácia nižšia, ako sa očakáva, je možné, že IC sa akumuloval v testovacom roztoku. Degradovateľnosť sa potom môže hodnotiť pomocou iných testov ľahkej biodegradovateľnosti.

▼M4

5. Ďalšie nedostatky Sturmovej metodiky (náročnosť vykonania, náročnosť na čas, náchylnosť k chybám pri pokusoch a nemožnosť použitia v prípade prchavých chemikálií) dali podnet k skúmaniu metódy uzavretej nádoby, ktorá by bola iná ako Gledhillova a ktorá by nahradila prúdenie plynu (10) (11). Boatman a kolektív (12) vyhodnotili predchádzajúce metódy a zaviedli systém uzavretého priestoru nad kvapalinou, v ktorom sa CO_2 na konci inkubácie uvoľňoval do priestoru nad kvapalinou prostredníctvom okysľovania média. CO_2 sa meral plynovou chromatografiou (GC)/analýzou IC vo vzorkách automaticky odoberaných z priestoru nad kvapalinou, ale nezohľadňoval sa rozpustený anorganický uhlík (DIC) v tekutej fáze. Takisto použité nádoby boli veľmi malé (20 ml) a obsahovali iba 10 ml média, čo spôsobovalo problémy napr. pri pridávaní nevyhnutne veľmi malých množstiev nerozpustných testovaných chemikálií a/alebo problém s mikroorganizmami schopnými degradovať testovanú chemikáliu, ktoré mohli byť v inokulovanom médiu prítomné v nedostatočnom množstve alebo vôbec.

6. Tieto problémy prekonali nezávislé štúdie Struijsa a Stoltenkampa (13) a Bircha a Fletchera (14), pričom druhých menovaných inšpirovali ich skúsenosti so zariadením používaným v teste anaeróbnej biodegradácie (15). V prvej metóde (13) sa CO_2 meria v priestore nad kvapalinou po acidifikácii a vyrovnaní, zatiaľ čo v druhej metóde (14) sa meria DIC v plynnej aj tekutej fáze bez ošetrenia. Vyše 90 % vytvoreného IC sa vyskytovalo v tekutej fáze. Obidve metódy majú oproti Sturmovmu testu výhody v tom, že testovací systém je kompaktnejší a ovládateľnejší, môžu sa testovať prchavé chemikálie a predišlo sa možnosti oneskorenia v meraní vyprodukovaného CO_2.

7. Tieto dva prístupy boli skombinované do normy ISO o CO_2 v uzavretom priestore nad kvapalinou (16), ktorá bola podrobená kruhovým testom (17), a práve táto norma predstavuje základ uvedenej testovacej metódy. Tieto dva prístupy sa podobne využili v metóde USA EPA (18). Odporúčajú sa dve metódy merania CO_2, konkrétne CO_2 v uzavretom priestore nad kvapalinou po acidifikácii (13) a IC v tekutej fáze po pridaní prebytočných alkálií. Druhú uvedenú metódu predstavil Peterson počas kruhového testu CONCAWE (19) tejto metódy uzavretého priestoru nad kvapalinou, ktorá bola modifikovaná na meranie inherentnej biodegradovateľnosti. Zmeny vykonané pri revízii metód z roku 1992 (20) v kapitole C.4 tejto prílohy týkajúce sa ľahkej biodegradovateľnosti boli začlenené do tejto testovacej metódy tak, aby podmienky (médium, trvanie atď.) boli inak rovnaké ako podmienky v revidovanom Sturmovom teste (20). Birch a Fletcher (14) preukázali, že pri tomto teste uzavretého priestoru nad kvapalinou sa dosiahli veľmi podobné výsledky, aké sa s rovnakými chemikáliami dosiahli v kruhovom teste OECD (21) revidovaných testovacích metód.

PRINCÍP TESTU

8. Testovaná chemikália, zvyčajne v koncentrácii 20 mg C/l, sa ako jediný zdroj uhlíka a energie inkubuje v tlmivom médiu s obsahom minerálnych solí, ktoré bolo inokulované zmiešanou populáciou mikroorganizmov. Test prebieha v hermeticky uzavretých fľašiach s priestorom nad kvapalinou obsahujúcim vzduch, ktorý predstavuje rezervoár kyslíka pre aeróbnu biodegradáciu. Uvoľňovanie CO_2, ktoré je dôsledkom úplnej aeróbnej biodegradácie testovanej chemikálie, sa stanoví meraním množstva IC vyprodukovaného v testovacích fľašiach, ktoré presahuje množstvo IC vyprodukované v slepých kontrolných nádobách obsahujúcich iba inokulované médium. Rozsah biodegradácie je vyjadrený ako percento teoretickej maximálnej produkcie IC (ThIC) založené na množstve testovanej chemikálie (ako organického uhlíka) pridanej na začiatku testu.

9. Takisto možno odmerať aj elimináciu DOC a/alebo rozsah primárnej biodegradácie testovanej chemikálie (20).

▼M4

INFORMÁCIE O TESTOVANEJ CHEMIKÁLII

10. Je potrebné poznať obsah organického uhlíka (hmotnostné percento) v testovanej chemikálii buď z jej chemickej štruktúry, alebo na základe merania, aby bolo možné vypočítať percentuálnu degradáciu. V prípade prchavých testovaných chemikálií je na stanovenie vhodného pomeru priestoru nad kvapalinou k objemu kvapaliny užitočná nameraná alebo vypočítaná Henryho konštanta. Pri výbere vhodnej testovacej koncentrácie a pri interpretácii výsledkov poukazujúcich na slabú biodegradovateľnosť sú užitočné informácie o toxicite testovanej chemikálie na mikroorganizmy: pokiaľ nie je známe, že testovaná chemikália nemá na mikrobiálnu činnosť inhibičné účinky, odporúča sa zahrnúť kontrolu inhibície (pozri odsek 24).

POUŽITEĽNOSŤ METÓDY

11. Test možno použiť na testované chemikálie rozpustné vo vode a na nerozpustné testované chemikálie, je však potrebné zabezpečiť dobrú disperziu testovanej chemikálie. Pri použití odporúčaného pomeru priestoru nad kvapalinou k objemu kvapaliny 1: 2 možno testovať prchavé chemikálie s Henryho konštantou do 50 $Pa.m^3.mol^{-1}$, lebo podiel testovanej chemikálie v uzavretom priestore nad kvapalinou nepresiahne 1 % (13). Pri testovaní prchavejších chemikálií možno použiť menší objem priestoru nad kvapalinou, ale ich biodostupnosť môže byť obmedzujúca, najmä ak sú slabo rozpustné vo vode. Používatelia však musia zabezpečiť, aby pomer priestoru nad kvapalinou k objemu kvapaliny a koncentrácia testovanej chemikálie boli také, aby bol k dispozícii dostatok kyslíka, ktorý umožňuje úplnú aeróbnu biodegradáciu (napr. sa treba vyhnúť používaniu vysokej koncentrácie substrátu a malého objemu priestoru nad kvapalinou). Usmernenia k tejto téme sú uvedené v bodoch (13) (23).

REFERENČNÉ CHEMIKÁLIE

12. Na kontrolu postupu testovania sa súbežne testuje referenčná chemikália so známou biodegradovateľnosťou. Na tento účel možno pri testovaní chemikálií rozpustných vo vode použiť anilín, benzoan sodný alebo etylénglykol a pri testovaní slabo rozpustných chemikálií 1-oktanol (13). Biodegradácia týchto chemikálií musí v priebehu 14 dní dosiahnuť úroveň > 60 % ThIC.

REPRODUKOVATEĽNOSŤ

13. V ISO kruhovom teste metódy (17) sa pri použití odporúčaných podmienok vrátane 20 mg C testovanej chemikálie/l získali tieto výsledky.

Testovaná chemikália	Stredná percentuálna biodegradácia (28 d)	Variačný koeficient (%)	Počet laboratórií
Anilín	90	16	17
1-oktanol	85	12	14

Variabilita v rámci testu (replikovateľnosť) pri použití anilínu bola takmer vo všetkých uskutočnených testoch v prípade variačných koeficientov nepresahujúcich 5 % nízka. V dvoch prípadoch, v ktorých bola replikovateľnosť horšia, bola väčšia variabilita pravdepodobne spôsobená vysokou produkciou IC v slepých kontrolných nádobách. Replikovateľnosť bola horšia v prípade 1-oktanolu, ale stále bola v 79 % uskutočnených testov pod úrovňou 10 %. Táto väčšia variabilita v rámci testu mohla byť spôsobená chybami v dávkovaní, lebo do hermeticky uzavretých testovacích fliaš sa musel vstreknúť malý objem (3 – 4 µl) 1-oktanolu. Pri použití nižších koncentrácií testovanej chemikálie by výsledné variačné koeficienty boli vyššie, a to najmä pri koncentráciách nižších ako 10 mg C/l. Čiastočne možno tento problém vyriešiť znížením koncentrácie celkového anorganického uhlíka (TIC) v inokule.

▼M4

14. Kruhový test EÚ (24) piatich povrchovo aktívnych činidiel pridávaných v koncentrácii 10 mg C/l priniesol tieto výsledky:

Testovaná chemikália	Stredná percentuálna biodegradácia (28 d)	Variačný koeficient (%)	Počet laboratórií
Tetrapropylén Benzénsulfonát	17	45	10
Di-izo-oktylsulfo-sukcinát (aniónový)	72	22	9
Hexadecyltrimetyl- amónium chlorid (katiónový) (*)	75	13	10
Izo-nonylfenol-(etoxylát)$_9$ (neiónový)	41	32	10
Koko-amid-propyl dimetylhydroxy sulfobetaín (amfotérny)	60	23	11

(*) SiO_2 bol pridaný s cieľom neutralizovať toxicitu.

Z výsledkov vyplýva, že vo všeobecnosti bola variabilita vyššia v prípade horšie degradovaných povrchovo aktívnych činidiel. Variabilita v rámci testu bola nižšia ako 15 % vo vyše 90 % prípadov, pričom najvyššia úroveň dosiahla 30 – 40 %.

Poznámka: Väčšina povrchovo aktívnych činidiel nie sú jednomolekulové substancie, ale zmesi izomérov, homológov atď., ktoré degradujú po rôznych charakteristických lag obdobiach a pri rôznych kinetických rýchlostiach, čo vedie k „nejasným“ podhodnoteným krivkám, takže hodnota úspešnosti 60 % sa v rámci „desaťdňového okna“ nemusí dosiahnuť, ani v prípade, že by každá individuálna molekulárna substancia pri samostatnom testovaní za desať dní dosiahla úroveň > 60 %. Tento jav možno pozorovať aj pri iných komplexných zmesiach.

OPIS METÓDY

Zariadenie

15. Bežné laboratórne zariadenie a:

a) sklenené sérové fľaše hermeticky uzavreté butylovými gumenými zátkami a tesniacimi hliníkovými uzávermi. Odporúčaná veľkosť je 125 ml, pričom celkový objem je približne 160 ml (v tomto prípade by mal známy objem každej fľaše byť 160 ± 1 ml). Menšie nádoby možno použiť, ak výsledky spĺňajú podmienky uvedené v odsekoch 66 a 67;

b) uhlíkový analyzátor alebo iný prístroj (napr. plynový chromatograf) na meranie anorganického uhlíka;

▼M4

c) striekačky s vysokou presnosťou na plynné a kvapalné vzorky;

d) orbitálna trepačka v prostredí s kontrolovanou teplotou;

e) prívod vzduchu bez obsahu CO_2 – môže sa pripraviť púšťaním vzduchu cez granule nátronového vápna alebo použitím plynnej zmesi 80 % N_2/20 % 0_2 (nepovinné) (pozri odsek 28);

f) membránové filtračné zariadenie s pórovitosťou 0,20 – 0,45 μm (nepovinné);

g) analyzátor organického uhlíka (nepovinné).

Činidlá

16. Vždy sa používajú analyticky čisté činidlá.

Voda

17. Používa sa destilovaná alebo deionizovaná voda s obsahom celkového organického uhlíka ≤ 1 mg/l. Táto hodnota predstavuje ≤ 5 % počiatočného obsahu organického uhlíka pridaného v odporúčanej dávke testovanej chemikálie.

Zásobné roztoky pre médium s obsahom minerálnych solí

18. Zásobné roztoky a médium s obsahom minerálnych solí sú podobné tým, ktoré sú špecifikované v norme ISO 14593 (16) a v testoch „ľahkej biodegradovateľnosti“ v kapitole C.4 (20). Použitie vyššej koncentrácie chloridu amónneho (2,0 g/l namiesto 0,5 g/l) je nutné iba vo výnimočných prípadoch, napr. ak je koncentrácia testovanej chemikálie > 40 mg C/l. Zásobné roztoky sú uskladnené v chlade a mali by sa zlikvidovať po šiestich mesiacoch alebo skôr, ak vykazujú známky zrážania alebo mikrobiálneho rastu. Pripravia sa tieto zásobné roztoky:

a) dihydrogénfosforečnan draselný (KH_2PO_4) 8,50 g,

hydrogénfosforečnan draselný (K_2HPO_4) 21,75 g,

dihydrát hydrogénfosforečnanu disodného ($Na_2HPO_4.2H_2O$) 33,40 g,

chlorid amónny (NH_4Cl) 0,50 g.

Rozpustí sa vo vode a doplní na jeden liter. Hodnota pH tohto roztoku by mala byť 7,4 (± 0,2). Ak tomu tak nie je, pripraví sa nový roztok;

b) dihydrát chloridu vápenatého ($CaCl_2.2H_2O$) 36,40 g.

Rozpustí sa vo vode a doplní na jeden liter;

c) heptahydrát síranu horečnatého ($MgSO_4.7H_2O$) 22,50 g.

Rozpustí sa vo vode a doplní na jeden liter;

d) chlorid železitý hexahydrát ($FeCl_3.6H_20$) 0,25 g.

Rozpustí sa vo vode a doplní na jeden liter, pričom sa pridá jedna kvapka koncentrovaného roztoku.

Príprava minerálneho média

19. Zmieša sa 10 ml roztoku v písmene a) s približne 800 ml vody (odsek 17), potom sa pridá 1 ml roztokov v písmenách b), c) a d) a doplní vodou (odsek 17) na jeden liter.

Iné činidlá

20. Koncentrovaná kyselina trihydrogénfosforečná (H_3PO_4) (> 85 % hmotnosti na objem).

▼M4

Roztok hydroxidu sodného 7 M

21. V jednom litri vody sa rozpustí 280 g hydroxidu sodného (NaOH) (odsek 17). Určí sa koncentrácia DIC tohto roztoku a táto hodnota sa zohľadní pri výpočte výsledkov testu (pozri odseky 55 a 61), najmä v súvislosti s kritériom platnosti podľa odseku 66 písm. b). Ak je koncentrácia DIC príliš vysoká, pripraví sa nový roztok.

Testovaná chemikália

22. Vo vode (odsek 17) alebo v testovacom médiu (odsek 19) sa pripraví zásobný roztok testovanej chemikálie, ktorá je dostatočne rozpustná vo vode, s koncentráciou pokiaľ možno stokrát vyššou, ako je konečná koncentrácia, ktorá sa použije v teste. Môže byť potrebné upraviť pH zásobného roztoku. Zásobný roztok sa pridá do minerálneho média, aby sa dosiahla konečná koncentrácia organického uhlíka medzi 2 a 40 mg C/l, ideálne 20 mg C/l. Použitie nižších ako uvedených koncentrácií môže mať za následok nižšiu presnosť. Rozpustné a nerozpustné kvapalné chemikálie možno do nádob pridávať priamo pomocou striekačiek s vysokou presnosťou. Slabo rozpustné a nerozpustné testované chemikálie môžu vyžadovať osobitné postupy (25). Možnosti sú tieto:

a) priame pridanie známych odvážených množstiev;

b) ultrazvuková disperzia pred pridaním;

c) disperzia pomocou emulgujúcich činidiel potrebná na zistenie inhibičných alebo stimulačných účinkov na mikrobiálnu činnosť pred pridaním;

d) adsorpcia kvapalnej testovanej chemikálie alebo roztoku vo vhodnom prchavom rozpúšťadle, na inertnom médiu alebo nosnom materiáli (napr. filter zo sklenených vlákien), po ktorej nasleduje odparenie rozpúšťadla, ak sa použilo, a priame pridanie známych množstiev;

e) pridanie známeho objemu roztoku testovanej chemikálie vo vysokoprchavom rozpúšťadle do prázdnej testovacej nádoby a následné odparenie rozpúšťadla.

Činidlá alebo rozpúšťadlá použité v písmenách c), d) a e) je potrebné testovať na zistenie akýchkoľvek stimulačných alebo inhibičných účinkov na mikrobiálnu činnosť [pozri odsek 42 písm. b)].

Referenčná chemikália

23. Vo vode sa pripraví zásobný roztok (rozpustnej) referenčnej chemikálie (odsek 17), s koncentráciou, pokiaľ možno stokrát vyššou, ako je konečná koncentrácia, ktorá sa použije (20 mg C/l) v teste.

Kontrola inhibície

24. Testované chemikálie v podmienkach použitých pri hodnotení ľahkej biodegradácie často nevykazujú významnú degradáciu. Jednou z možných príčin je skutočnosť, že testovaná chemikália v koncentrácii, v ktorej sa aplikuje v teste, má na inokulum inhibičné účinky. Do koncepcie testu sa môže zahrnúť kontrola inhibície s cieľom umožniť identifikáciu (pri spätnom pohľade) inhibície ako možnej príčiny alebo prispievajúceho faktora. Kontrolou inhibície možno prípadne takéto interferencie vylúčiť a preukázať, že nulovú alebo nepatrnú degradáciu možno pripísať výhradne rezistencii voči mikrobiálnemu napadnutiu v podmienkach testu. Na účely získania informácií o toxických účinkoch testovanej chemikálie na (aeróbne) mikroorganizmy sa pripraví roztok v testovacom médiu obsahujúci testovanú chemikáliu a referenčnú chemikáliu (odsek 19), každý v rovnakej koncentrácii, v akej sa pridáva (pozri odsek 22 a 23).

▼M4

Inokulum

25. Inokulum možno získať z rôznych zdrojov: aktivovaný kal, výtok splaškových vôd (nechlórovaný), povrchové vody a pôdy alebo zmes uvedeného (20). Biodegradačnú činnosť zdroja treba skontrolovať pomocou referenčnej chemikálie. Ak sa daný postup použije ako test ľahkej biodegradovateľnosti, bez ohľadu na zdroj by sa nemali použiť mikroorganizmy, ktoré boli predtým exponované testovanej chemikálii.

Upozornenie: Aktivovaný kal, splaškové vody a výtok splaškových vôd obsahujú choroboplodné organizmy a je nutné s nimi zaobchádzať opatrne.

26. Na základe skúseností je optimálny objem inokula taký, ktorý:

— je dostatočný na zabezpečenie primeranej biodegradačnej činnosti,

— degraduje referenčnú chemikáliu o stanovené percento (pozri odsek 66),

— poskytuje $10^2 – 10^5$ jednotiek tvoriacich kolónie na mililiter v konečnej zmesi,

— zvyčajne poskytuje koncentráciu 4 mg/l suspendovaných tuhých látok v konečnej zmesi pri použití aktivovaného kalu; môžu sa použiť koncentrácie do 30 mg/l, ale tie môžu významne zvýšiť produkciu CO_2 v slepých kontrolných nádobách (26),

— predstavuje menej ako 10 % počiatočnej koncentrácie organického uhlíka zavedeného testovanou chemikáliou,

— predstavuje vo všeobecnosti 1 – 10 ml inokula na jeden liter testovacieho roztoku.

Aktivovaný kal

27. Odoberie sa čerstvá vzorka aktivovaného kalu z prevzdušňovacej nádrže čističky odpadových vôd alebo z laboratórnej jednotky, ktoré spracúvajú prevažne domáce splaškové vody. V prípade potreby sa cedením odstránia hrubé častice (napr. pomocou cedidla, ktorého oká majú veľkosť 1 mm^2) a kal sa až do použitia uskladňuje v aeróbnych podmienkach.

28. Po odstránení hrubých častíc sa prípadne nechá sedimentovať alebo sa odstredí (napr. 1 100 × g na 10 minút). Supernatantová kvapalina sa zleje. Kal sa môže premyť v minerálnom roztoku. Koncentrovaný kal sa suspenduje v minerálnom médiu s cieľom získať koncentráciu 3 – 5 g suspendovaných tuhých látok/l. Následne sa prevzdušňuje podľa potreby.

29. Kal sa odoberie zo správne pracujúcej čističky. Ak sa musí kal odobrať z vysokostupňovej čističky alebo je možné, že obsahuje inhibítory, mal by sa premyť. Po dôkladnom premiešaní sa sedimentuje alebo odstredí resuspendovaný kal, odstráni sa supernatantová kvapalina a premytý kal znovu suspenduje v ďalšom objeme minerálneho média. Tento postup sa opakuje, kým sa z kalu neodstráni nadbytočný substrát alebo inhibítor.

30. Z úplne resuspendovaného alebo neošetreného kalu sa odoberie vzorka tesne pred použitím na stanovenie suchej hmotnosti suspendovaných tuhých látok.

31. Ďalšou alternatívou je homogenizácia aktivovaného kalu (3 – 5 g suspendovaných tuhých látok/l). Kal sa prevzdušňuje v mixéri Waring dve minúty pri strednej rýchlosti. Zmiešaný kal sa nechá sedimentovať 30 minút, alebo ak je to potrebné, aj dlhšie, a dekantuje sa kvapalinou na nižšie použitie ako inokulum v množstve 10 mg/l minerálneho média.

▼M4

32. Ďalšie zníženie uvoľňovania čistého CO_2 možno dosiahnuť prevzdušňovaním kalu počas noci vzduchom bez obsahu CO_2. Ako inokulum sa v tomto teste použije koncentrácia 4 mg/l tuhých látok aktivovaného kalu (13).

Sekundárny výtok splaškových vôd

33. Inokulum možno prípadne získať zo sekundárneho výtoku čističky alebo z laboratórnej jednotky, ktoré prevažne spracúvajú domáce splaškové vody. Vzorka sa udržiava v aeróbnych podmienkach a použije sa v deň odberu alebo sa podľa potreby aklimatizujte. Výtok sa prefiltruje cez hrubý filter, aby sa odstránili hrubé pevné častice, a odmeria sa hodnota pH.

34. Filtrát sa s cieľom zníženia obsahu IC počas jednej hodiny čerí vzduchom bez obsahu CO_2 [odsek 15 písm. e)], pričom hodnota pH sa udržiava na úrovni 6,5 pomocou kyseliny trihydrogénfosforečnej (odsek 20). Hodnota pH sa zmení na pôvodnú úroveň pomocou hydroxidu sodného (odsek 21) a po približne hodinovej sedimentácii sa odoberie vhodné množstvo supernatantu na inokuláciu. Týmto postupom čerenia sa znižuje obsah IC v inokule. Napríklad ak sa ako inokulum použil maximálny odporúčaný objem filtrovaného čereného výtoku (100 ml) na liter, množstvo IC prítomné v slepých kontrolných nádobách bolo v rozsahu 0,4 – 1,3 mg/l (14), čo predstavuje 2 – 6,5 % C testovanej chemikálie pri 20 mg C/l a 4 – 13 % pri 10 mg C/l.

Povrchové vody

35. Z vhodnej povrchovej vody sa odoberie vzorka. Mala by sa udržiavať v aeróbnych podmienkach a použiť v deň odberu. Vzorka sa podľa potreby koncentruje filtráciou alebo odstredením. Objem inokula, ktoré sa použije v každej testovacej nádobe, by mal spĺňať kritériá uvedené v odseku 26.

Pôda

36. Z maximálnej hĺbky 20 cm pod pôdnym povrchom sa odoberie vzorka vhodnej pôdy. Skôr než sa vzorka pôdy preoseje cez sito s veľkosťou ôk 2 mm, odstránia sa z nej kamene, zvyšky rastlín a bezstavovcov (ak je vzorka príliš mokrá a nie je možné ju ihneď preosiať, čiastočne sa usuší vzduchom, aby sa uľahčilo preosievanie). Vzorka sa udržiava v aeróbnych podmienkach a použije sa v deň odberu. (Ak sa vzorka prenáša vo voľne uviazanom čiernom polyetylénovom vreci, možno ju v tomto vreci skladovať pri teplote 2 – 4 °C až jeden mesiac).

Aklimatizácia inokula

37. Inokulum sa môže aklimatizovať na experimentálne podmienky, ale nie predadaptovať na testovanú chemikáliu. Aklimatizáciou možno znížiť uvoľňovanie čistého CO_2. Aklimatizácia pozostáva z prevzdušňovania aktivovaného kalu po zriedení v testovacom médiu na úroveň 30 mg/l pomocou vlhkého vzduchu bez obsahu CO_2 v trvaní päť až sedem dní pri testovacej teplote.

POSTUP TESTOVANIA

Počet fliaš

38. Počet fliaš [odsek 15 písm. a)] potrebný na test bude závisieť od frekvencie analýz a trvania testu.

39. Odporúča sa analyzovať trojice fliaš po dostatočnom počte časových intervalov, aby sa mohlo určiť desaťdňové okno. Na konci testu sa takisto analyzuje najmenej päť testovacích fliaš [odsek 15 písm. a)] zo súborov fliaš v písmenách a), b) a c) (pozri odsek 42) s cieľom umožniť výpočet 95 % intervalov spoľahlivosti pre strednú hodnotu percentuálnej biodegradácie.

▼M4

Inokulované médium

40. Inokulum sa použije pri koncentrácii 4 mg/l suchých tuhých látok v aktivovanom kale. Tesne pred použitím sa pripraví dostatočne inokulované médium pridaním napríklad 2 ml vhodne upraveného aktivovaného kalu (odseky 27 – 32) s koncentráciou 2 000 mg/l do jedného litra média s obsahom minerálnych solí (odsek 19). Ak sa použije sekundárny výtok splaškových vôd, maximálne 100 ml výtoku (odsek 33) sa pridá do 900 ml média s obsahom minerálnych solí (odsek 19) a zriedi sa médiom na jeden liter.

Príprava fliaš

41. Alikvotné časti inokulovaného média sa rozdelia do paralelných fliaš tak, aby bol pomer priestoru nad kvapalinou ku kvapaline 1: 2 (napr. sa pridá 107 ml do fliaš s kapacitou 160 ml). Možno použiť aj iné pomery, ale treba venovať pozornosť varovaniu uvedenému v odseku 11. Bez ohľadu na použité inokulum je nutné sa uistiť, že inokulované médium je dostatočne premiešané, aby sa zabezpečila jeho rovnomerná distribúcia do fliaš.

42. Pripravia sa súbory fliaš [odsek 15 písm. a)], ktoré obsahujú:

a) testovacie nádoby (označené F_T) obsahujúce testovanú chemikáliu;

b) slepé kontrolné nádoby (označené F_B) obsahujúce iba testovacie médium a inokulum; takisto sa musia pridať všetky chemikálie, rozpúšťadlá, činidlá alebo filtre zo sklenených vlákien, ktoré sa použili na zavedenie testovanej chemikálie do testovacích nádob;

c) nádoby (označené F_C) na kontrolu postupu obsahujúce referenčnú chemikáliu;

d) v prípade potreby nádoby (označené F_I) na kontrolu možných inhibičných účinkov testovanej chemikálie obsahujúce testovanú chemikáliu aj referenčnú chemikáliu v rovnakých koncentráciách (odsek 24) ako vo fľašiach F_T a F_C;

e) nádoby (označené F_S) na kontrolu možnej abiotickej degradácie ako v písmene a) plus 50 mg/l $HgCl_2$ alebo sterilizované inými prostriedkami (napr. v autokláve).

43. Vo vode rozpustné testované chemikálie a referenčné chemikálie sa pridajú ako vodné zásobné roztoky (odseky 22, 23 a 24), aby sa dosiahla koncentrácia 10 – 20 mg C/l.

44. Nerozpustné testované chemikálie a nerozpustné referenčné chemikálie sa pridajú do fliaš rôznymi spôsobmi [pozri odsek 22 písm. a) – e)] podľa charakteru testovanej chemikálie pred alebo po pridaní inokulovaného média v závislosti od metódy aplikácie testovanej chemikálie. Ak sa použije jeden z postupov uvedených v odseku 22 písm. a) – e), potom by sa so slepými fľašami F_B [odsek 42 písm. b)] malo naložiť podobným spôsobom, ale s vylúčením testovanej chemikálie alebo referenčnej chemikálie.

45. Prchavé testované chemikálie sa pomocou mikrostriekačky vstreknú do hermeticky uzavretých fliaš (odsek 47). Dávka sa vypočíta zo vstreknutého objemu a hustoty testovanej chemikálie.

46. Podľa potreby sa do nádob pridá voda, aby bol v každej nádobe rovnaký objem kvapaliny. Treba zabezpečiť, aby pomer priestoru nad kvapalinou ku kvapaline (zvyčajne 1: 2) a koncentrácia testovanej chemikálie boli nastavené tak, aby bol k dispozícii dostatok kyslíka, ktorý umožní úplnú biodegradáciu.

▼M4

47. Všetky fľaše sa potom hermeticky uzatvoria napríklad butylovými gumenými priehradkami a hliníkovými uzávermi. Prchavé testované chemikálie je potrebné pridať v tejto fáze (odsek 45). Na účely monitorovania poklesu koncentrácie DOC testovanej chemikálie a analýz, ktoré sa vykonávajú v nulovom čase pri počiatočnej koncentrácii IC [sterilné kontroly, odsek 42 písm. e)], alebo iných determinantov sa z testovacej nádoby odoberie primeraná vzorka. Testovacia nádoba a jej obsah sa následne zlikviduje.

48. Hermeticky uzavreté fľaše sa umiestnia na rotačnú trepačku [odsek 15 písm. d)] s rýchlosťou pretrepávania, ktorá je dostatočná na to, aby obsahy fliaš ostali dobre premiešané a v suspenzii (napr. 150 – 200 rpm), a následne sa inkubujú v tme pri teplote 20 °C a skladujú pri tejto teplote v rozmedzí ± 1 °C.

Odber vzoriek

49. Systém odberu vzoriek bude závisieť od lag fázy a kinetickej rýchlosti biodegradácie testovanej chemikálie. V deň odberu vzoriek sa fľaše zlikvidujú na účely analýzy, čo by sa malo vykonávať najmenej raz do týždňa alebo častejšie (napr. dvakrát do týždňa), ak sa požaduje úplná krivka degradácie. Z trepačky sa odoberie požadovaný počet paralelných fliaš predstavujúcich F_T, F_B a F_C a, ak sa použili, F_I a F_S (pozri odsek 42). Test zvyčajne trvá 28 dní. Ak z biodegradačnej krivky vyplýva, že sa dosiahol rovnovážny stav pred uplynutím 28 dní, test môže byť ukončený skôr. Z piatich fliaš vyhradených na 28. deň testu sa odoberú vzorky na analýzu a výsledky sa použijú na výpočet limitov spoľahlivosti alebo variačného koeficientu percentuálnej biodegradácie. Z fliaš, ktoré slúžia ako kontroly inhibície a abiotickej degradácie, nie je potrebné odoberať vzorky tak často ako z ostatných fliaš; postačuje deň 1 a deň 28.

Analýza anorganického uhlíka (IC)

50. Produkcia CO_2 vo fľašiach sa zistí tak, že sa odmeria zvýšenie koncentrácie anorganického uhlíka (IC) počas inkubácie. Na meranie množstva IC vyprodukovaného v teste sú k dispozícii dve odporúčané metódy, ktoré sú opísané ďalej. Keďže výsledky týchto metód sa môžu mierne líšiť, v priebehu testu by sa mala použiť iba jedna.

51. Metóda a) sa odporúča, ak médium pravdepodobne obsahuje napríklad zvyšky papiera zo skleneného filtra a/alebo nerozpustnej testovanej chemikálie. Ak nie je k dispozícii uhlíkový analyzátor, možno túto analýzu možno vykonať pomocou plynového chromatografu. Je dôležité, aby mali fľaše počas analýzy plynu v uzavretom priestore nad kvapalinou teplotu, ktorá je rovnaká alebo sa blíži k testovacej teplote. Metóda b) môže byť jednoduchšia pre laboratóriá, ktoré na meranie IC používajú uhlíkový analyzátor. Je dôležité, aby bol roztok hydroxidu sodného (odsek 21), ktorý sa použije na premenu CO_2 na uhličitan, čerstvo pripravený alebo aby bol známy jeho obsah IC, takže bude možné ho zohľadniť pri výpočte výsledkov testu [pozri odsek 66 písm. b)].

Metóda a): acidifikácia na pH < 3

52. Pred každou várkou analýz sa IC analyzátor nakalibruje pomocou vhodného štandardu IC (napr. 1 % hmotnostného CO_2 v N_2). Koncentrovaná kyselina trihydrogénfosforečná (odsek 20) sa vstrekne cez priehradku každej fľaše, z ktorej sa odoberá vzorka, s cieľom znížiť pH média na úroveň < 3 (napr. sa pridá 1 ml do 107 ml testovacieho média). Fľaše sa umiestnia späť do trepačky. Po jednohodinovom pretrepávaní pri testovacej teplote sa fľaše vyberú z trepačky, odoberú sa alikvotné časti (napr. 1 ml) plynu z uzavretého priestoru nad kvapalinou každej fľaše a vstreknú sa do IC analyzátora. Namerané koncentrácie IC sa zaznamenajú v jednotkách mg C/l.

▼M4

53. Princípom tejto metódy je, že po acidifikácii na pH < 3 a vyvážení pri teplote 20 °C je rovnovážna konštanta pre distribúciu CO_2 medzi kvapalnou a plynnou fázou v testovacích fľašiach 1,0 v prípade, že sa meria ako koncentrácia (13). Tento fakt je potrebné pre testovací systém aspoň raz preukázať týmto spôsobom:

Založia sa fľaše obsahujúce 5 a 10 mg/l IC s využitím roztoku bezvodého uhličitanu sodného (Na_2CO_3) vo vode bez obsahu CO_2, ktorý sa pripraví tak, že voda sa pomocou koncentrovanej kyseliny trihydrogénfosforečnej okyslí na pH 6,5 (odsek 20), počas noci sa čerí pomocou vzduchu bez obsahu CO_2 a pomocou alkálie sa jeho pH zvýši na neutrálnu úroveň. Je potrebné zabezpečiť, aby bol pomer objemu uzavretého priestoru nad kvapalinou k objemu kvapaliny rovnaký ako v testoch (napr. 1 : 2). Obsah fliaš sa okyslí a vyváži podľa opisu v odseku 52 a odmeria sa koncentrácia IC v uzavretom priestore nad kvapalinou, ako aj v kvapalnej fáze. Skontroluje sa, či sú tieto dve koncentrácie v rozsahu pokusnej chyby rovnaké. Ak nie sú, pracovník by mal skontrolovať postupy. Túto kontrolu distribúcie IC medzi kvapalnou a plynnou fázou nie je potrebné vykonať počas každého testu. Pravdepodobne ju bude možné vykonať počas kalibrácie.

54. Ak sa meria eliminácia DOC (iba testované chemikálie rozpustné vo vode), vzorky z kvapalnej fázy sa odoberú zo samostatných (neokyslených) fliaš, prefiltrujú sa cez membránu a vstreknú sa do analyzátora DOC. Tieto fľaše možno v prípade potreby použiť pri iných analýzach na meranie primárnej biodegradácie.

Metóda b): premena CO_2 na uhličitan

55. Pred každou várkou analýz sa IC analyzátor nakalibruje pomocou vhodného štandardu, ako je napríklad roztok hydrogénuhličitanu sodného ($NaHCO_3$) vo vode bez obsahu CO_2 (pozri odsek 53) v rozsahu 0 – 20 mg/l ako IC. Roztok hydroxidu sodného (7M, odsek 21) (napr. 1 ml do 107 ml média) sa vstrekne cez priehradku každej fľaše, z ktorej sa odoberajú vzorky, a fľaše sa nechajú pretrepávať pri testovacej teplote jednu hodinu. V prípade všetkých fliaš zlikvidovaných v daný deň sa použije rovnaký roztok NaOH, ale nemusí sa nevyhnutne použiť pri každom odbere vzoriek počas testu. Ak sa v čase každého odberu vzoriek požadujú absolútne hodnoty IC v slepých pokusoch, bude potrebné stanoviť IC roztoku NaOH pri každom použití. Fľaše sa vyberú z trepačky a nechajú sa sedimentovať. Striekačkou sa z každej nádoby odoberú vhodné objemy (napr. 50 – 1 000 µl) kvapalnej fázy. Vzorky sa vstreknú do IC analyzátora a zaznamenajú sa koncentrácie IC. Je potrebné zabezpečiť, aby bol použitý analyzátor správne vybavený na spracovanie zásaditých vzoriek produkovaných pri tejto metóde.

56. Princípom tejto metódy je, že po pridaní alkálie a pretrepaní je koncentrácia IC v uzavretom priestore nad kvapalinou zanedbateľná. Tento fakt je pre testovací systém nutné aspoň raz skontrolovať pomocou štandardov IC, pridaním alkálie, vyvážením a odmeraním koncentrácie IC v uzavretom priestore nad kvapalinou, ako aj v kvapalnej fáze (pozri odsek 53). Koncentrácia v uzavretom priestore nad kvapalinou by sa mala blížiť nule. Túto kontrolu prakticky úplnej absorpcie CO_2 nie je potrebné vykonávať pri každom teste.

57. Ak sa meria eliminácia DOC (iba testované chemikálie rozpustné vo vode), vzorky z kvapalnej fázy sa odoberú zo samostatných fliaš (neobsahujúcich žiadne pridané alkálie), prefiltrujú sa cez membránu a vstreknú sa do analyzátora DOC. Tieto fľaše možno v prípade potreby použiť pri iných analýzach na meranie primárnej biodegradovateľnosti.

▼M4

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Výpočet výsledkov

58. Pri predpoklade stopercentnej mineralizácie testovanej chemikálie na CO_2 sa nadbytočný ThIC vyprodukovaný v slepých kontrolných testoch rovná TOC pridanému do každej testovacej fľaše na začiatku testu, teda:

$$ThIC = TOC$$

Celková hmotnosť (mg) anorganického uhlíka (TIC) v každej fľaši je:

$$TIC = (\text{mg Cv kvapaline} + \text{mg Cv uzavretom priestore nad kvapalinou}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \quad \text{rovnica [1]}$$

kde:

V_L = objem kvapaliny vo fľaši (litre),

CL = koncentrácia IC v kvapaline (mg/l ako uhlík),

VH = objem uzavretého priestoru nad kvapalinou (litre),

CH = koncentrácia IC v uzavretom priestore nad kvapalinou (mg/l ako uhlík).

Výpočty TIC pre dve analytické metódy použité na meranie IC v tomto teste sú opísané ďalej v odsekoch 60 a 61. Percentuálna biodegradácia (*% D*) sa v jednotlivých prípadoch vypočíta podľa vzorca:

$$\%D = \frac{(TIC_t - TIC_b)}{TOC} \times 100 \quad \text{rovnica [2]}$$

kde:

TIC_t = mg TIC v testovacej fľaši v čase t,

TIC_b = stredná mg TIC v slepých kontrolných fľašiach v čase t,

TOC = mg TOC pridaná do testovacej nádoby na začiatku.

Z príslušných množstiev TIC vyprodukovaných do časov odberu sa vypočíta percentuálna biodegradácia, % D, pre testovacie (F_T), referenčné (F_C) a, ak sú zahrnuté, kontrolné (F_I) fľaše na monitorovanie inhibície.

59. Ak v priebehu testovacieho obdobia došlo k výraznému zvýšeniu obsahu TIC sterilných kontrolných fliaš (F_S), potom možno vyvodiť záver, že došlo k abiotickej degradácii testovanej chemikálie, ktorú treba zohľadniť pri výpočte D v rovnici [2].

Acidifikácia na pH < 3

60. Keďže acidifikácia na pH < 3 a vyvažovanie vedie k vyrovnaniu koncentrácie TIC v kvapalnej a plynnej fáze, stačí odmerať iba koncentráciu IC v plynnej fáze. Teda z rovnice [1] $TIC = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, kde V_B = objem sérovej fľaše.

Premena CO_2 na uhličitan

61. Pri tejto metóde sú výpočty rovnaké ako v rovnici [1], ale zanedbateľné množstvo IC v plynnej fáze sa ignoruje, čiže $V_H \times C_H = 0$ a $TIC = V_L \times C_L$.

▼M4

Vyjadrenie výsledkov

62. Krivka biodegradácie sa získa tak, že sa zakreslí percentuálna biodegradácia, D, v závislosti od času inkubácie a podľa možnosti sa naznačí lag fáza, biodegradačná fáza, desaťdňové okno a rovnovážna fáza, teda fáza, v ktorej sa dosiahla maximálna degradácia a krivka biodegradácie sa vyrovnala. Ak sa pre súbežné testovacie nádoby získajú porovnateľné výsledky F_T (< 20 % rozdiel), zakreslí sa stredná krivka (pozri dodatok 2, obrázok 1), ak nie, krivky sa zakreslia pre každú nádobu. Stanoví sa stredná hodnota percentuálnej biodegradácie v rovnovážnej fáze alebo sa posúdi najvyššia hodnota (napr. keď krivka v rovnovážnej fáze klesá), ale je dôležité zvážiť, či v druhom prípade nejde o odľahlú hodnotu. Táto maximálna úroveň biodegradácie sa v správe o teste uvedie ako „stupeň biodegradácie testovanej chemikálie“. Ak počet testovacích nádob nebol na naznačenie rovnovážnej fázy dostatočný, na výpočet strednej hodnoty sa použijú údaje namerané v posledný deň testu. Táto posledná hodnota, priemer piatich replikátov, slúži na určenie presnosti, s ktorou bola stanovená percentuálna biodegradácia. Do správy sa uvedie aj hodnota získaná na konci desaťdňového okna.

63. Rovnakým spôsobom sa zakreslí krivka pre referenčnú chemikáliu, F_C, a, ak je zahrnutá, pre abiotickú kontrolu eliminácie, F_S, a kontrolu inhibície, F_I.

64. Zaznamenajú sa množstvá TIC prítomné v slepých kontrolných nádobách (F_B), rovnako ako množstvá v bankách F_S (abiotická kontrola), ak takéto nádoby boli zahrnuté do testu.

65. Vypočíta sa D pre nádoby F_I podľa teoretického nárastu IC očakávaného iba v dôsledku referenčnej zložky zmesi. Ak v deň 28 $[(D_{FC}\,(^1) - D_{FI}\,(^2))/D_{FC}] \times 100 > 25$ %, možno predpokladať, že testovaná chemikália potlačila činnosť inokula, čo mohlo viesť k nízkym hodnotám D_{FT} získaným v podmienkach testu. V takom prípade možno test opakovať s využitím nižšej testovacej koncentrácie a podľa možnosti znížením DIC v inokule a TIC vytvorenej v slepých kontrolných nádobách, lebo nižšia koncentrácia bude mať inak za následok menšiu presnosť metódy. Prípadne možno použiť iné inokulum. Ak je vo fľaši F_S (abiotická) pozorované výrazné zvýšenie (> 10 %) množstva TIC, mohlo dôjsť k abiotickým degradačným procesom.

Platnosť výsledkov

66. Test sa považuje za platný, ak:

a) stredná percentuálna degradácia v nádobách F_C obsahujúcich referenčnú chemikáliu je > 60 % do 14. dňa inkubácie a

b) stredné množstvo TIC prítomnej v slepých kontrolných nádobách F_B na konci testu je > 3 mg C/l.

Ak tieto limity nie sú splnené, test by sa mal zopakovať s využitím inokula z iného zdroja a/alebo je potrebné preveriť použité postupy. Napríklad ak je problémom vysoká produkcia IC v slepých kontrolných nádobách, treba sa riadiť postupom uvedeným v odsekoch 27 – 32.

(1) Percentuálna degradácia v nádobách F_C obsahujúcich referenčnú látku.
(2) Percentuálna degradácia v nádobách F_I.

▼M4

67. Ak testovaná chemikália nedosiahne 60 % ThIC a preukáže sa, že nemá inhibičné účinky (odsek 65), test možno zopakovať pri vyššej koncentrácii inokula (až do 30 mg/l aktivovaného kalu a 100 ml výtoku/l) alebo s využitím inokúl z iných zdrojov, najmä ak bola degradácia v rozsahu 20 – 60 %.

Interpretácia výsledkov

68. Biodegradácia > 60 % ThIC počas desaťdňového okna v tomto teste preukazuje, že testovaná chemikália ja ľahko biodegradovateľná v aeróbnych podmienkach.

69. Ak sa nedosiahne hraničná hodnota 60 % ThIC, stanoví sa hodnota pH v médiách vo fľašiach, ktoré sa neacidifikovali ani nealkalizovali. Hodnota pod 6,5 môže znamenať, že došlo nitrifikácii. V takom prípade je potrebné test zopakovať s tlmivým roztokom vyššej koncentrácie.

Správa o teste

70. Pre každý deň, v ktorom sa odoberali vzorky, sa zostaví tabuľka % D pre každú testovaciu (F_T), referenčnú (F_C) a, ak bola zahrnutá, inhibičnú kontrolnú fľašu (F_I). Ak sa v prípade paralelných fliaš získajú porovnateľné výsledky, zakreslí sa krivka strednej hodnoty % D v závislosti od času. Zaznamená sa množstvo TIC v slepých kontrolných (F_B) a v sterilných kontrolných nádobách (F_S), DOC a/alebo ostatných determinantov a ich percentuálna eliminácia.

71. Stanoví sa stredná hodnota % D v rovnovážnej fáze alebo v prípade, že biodegradačná krivka v rovnovážnej fáze klesá, sa použije najvyššia hodnota a táto hodnota sa v správe uvedie ako „stupeň biodegradácie testovanej chemikálie“. Je dôležité zabezpečiť, aby v druhom prípade najvyššia hodnota nebola odľahlá.

72. Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— bežný názov, chemický názov, číslo CAS, štrukturálny vzorec a významné fyzikálno-chemické vlastnosti,

— čistota (nečistoty) testovanej chemikálie.

Podmienky testovania:

— odkaz na túto testovaciu metódu,

— opis použitého testovacieho systému (napr. objem nádoby, pomer uzavretého priestoru nad kvapalinou a kvapaliny, metóda miešania atď.),

— aplikácia testovanej chemikálie a referenčnej chemikálie v testovacom systéme: použitá testovacia koncentrácia a množstvo uhlíka dávkované do každej testovacej fľaše, použitie akýchkoľvek rozpúšťadiel,

— údaje o použitom inokule, akomkoľvek predchádzajúcom ošetrení a aklimatizácii,

— inkubačná teplota,

— overenie princípu analýzy IC,

— hlavné charakteristiky použitého IC analyzátora (a všetkých ostatných použitých analytických metód),

— počet replikátov.

Výsledky:

— nespracované údaje a vypočítané hodnoty biodegradovateľnosti v tabuľkovej forme,

▼M4

— graf percentuálnej degradácie v závislosti od času pre testovanú a referenčnú chemikáliu, lag fáza, fáza degradácie, desaťdňové okno a sklon,

— percentuálna eliminácia v rovnováhe, na konci testu a po desaťdňovom okne,

— dôvody pre akékoľvek odmietnutie testovacích výsledkov,

— akékoľvek ďalšie skutočnosti, ktoré majú význam pre použitý postup,

— rozbor výsledkov.

LITERATÚRA

1. Kapitola C.4 tejto prílohy, Stanovenie „ľahkej“ biodegradovateľnosti – test uvoľňovania CO_2 (metóda C.4-C).

2. Sturm, R. N. (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. J.A,.Oil Chem Soc. 50: 159 – 167.

3. Larson, R. J. (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. Appl Env. Microbiol. 38: 1153 – 1161.

4. Larson, R. J., Hansmann, M. A., a Bookland, E. A. (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, Chemosphere 33: 1195 – 1210.

5. ISO 9439 (1990; revidované 1999). Kvalita vody. Hodnotenie úplnej aeróbnej biodegradability organických látok vo vodnom prostredí. Skúška tvorby oxidu uhličitého (Sturm)

6. US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

7. US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.

8. Gledhill, W. E. (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. Appl Microbiol. 30: 922 – 929.

9. Weytjens, D., Van Ginneken, I., a Painter, H. A. (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. Chemosphere 28: 801 – 812.

10. Ennis, D. M., a Kramer, A. (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. J. Food Sci. 40: 181 – 185.

11. Ennis, D. M., Kramer, A., Jameson, C. W., Mazzoccki, P. H., a Bailey, P. H. (1978). Appl. Env. Microbiol. 35: 51 – 53.

12. Boatman, R. J., Cunningham, S. L., a Ziegler, D. A. (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, Env. Toxicol. Chem. 5: 233 – 243.

13. Struijs, J., a Stoltenkamp, J. (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. Ecotox. Env. Safety 19: 204 – 211.

14. Birch, R. R., a Fletcher, R. J. (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. Chemosphere 23: 507 – 524.

15. Birch, R. R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W. E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H., a Bontinck, W. J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19: 1527 – 1550.

▼**M4**

16. ISO 14593, (1999) Kvalita vody. Hodnotenie úplnej aeróbnej biodegradability organických látok vo vodnom prostredí. Metóda analýzy uvoľneného anorganického uhlíka v uzavretých nádobách (skúška CO_2 headspace)

17. Battersby, N. S. (1997). The ISO headspace $C0_2$ biodegradation test, Chemosphere 34: 1813 – 1822.

18. US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.

19. Battersby, N. S., Ciccognani, D., Evans, M. R., King, D., Painter, H. A., Peterson, D. R., a Starkey, M. (1999). An „inherent“ biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. Chemosphere 38: 3219 – 3235.

20. Kapitola C.4 tejto prílohy, Stanovenie „ľahkej“ biodegradovateľnosti.

21. OECD (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Správa predsedu (M. Hashimoto; MITI) a záverečná správa (M. Kitano a M. Takatsuki; CITI). Paríž.

22. Kapitola C.11 tejto prílohy, Respiračno-inhibičný test aktivovaného kalu.

23. Struijs, J., Stoltenkamp-Wouterse, M. J., a Dekkers, A. L. M. (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. Biodegradation 6: 319 – 327.

24. EÚ (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO_2 method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, máj 1999, Medmenham, SL7 2HD, Spojené kráľovstvo.

25. ISO 10634 (1996) Kvalita vody. Pokyny na prípravu a spracovanie organických látok málo rozpustných vo vode na následné hodnotenie ich biodegradability vo vodnom prostredí.

▼M4

Dodatok 1

SKRATKY A VYMEDZENIE POJMOV

IC: anorganický uhlík.

$ThCO_2$: teoretický oxid uhličitý (mg) je vypočítané množstvo oxidu uhličitého, ktoré sa vytvorí zo známeho alebo odmeraného obsahu uhlíka v testovanej chemikálii, keď je kompletne mineralizovaná. Je vyjadrený aj ako mg oxidu uhličitého uvoľneného z mg testovanej chemikálie.

DOC: rozpustený organický uhlík je organický uhlík prítomný v roztoku alebo ten, ktorý prechádza cez 0,45-mikrometrový filter alebo ostáva v supernatante po odstredení pri cca. 4 000 g (približne 40 000 m s^{-2}) počas 15 minút.

DIC: rozpustený anorganický uhlík.

ThIC: teoretický anorganický uhlík.

TIC: celkový anorganický uhlík.

Ľahko biodegradovateľné: dohodnutá klasifikácia chemikálií, ktoré prešli cez určité špecifické skríningové testy na úplnú biodegradovateľnosť. Tieto testy sú také prísne, že sa predpokladá, že takéto chemikálie sa budú rýchlo a úplne biodegradovať vo vodnom prostredí v aeróbnych podmienkach.

Desaťdňové okno: desať dní nasledujúcich ihneď po dosiahnutí 10 % degradácie.

Inherentná biodegradovateľnosť: klasifikácia chemikálií, pre ktoré existuje jednoznačný dôkaz ich biodegradácie (primárnej alebo úplnej) v každom teste na biodegradovateľnosť.

Úplná aeróbna biodegradácia: úroveň degradácie, ktorá sa dosiahne, keď testovanú chemikáliu úplne spotrebujú mikroorganizmy, čoho výsledkom je tvorba oxidu uhličitého, vody, minerálnych solí a nových mikrobiálnych bunkových zložiek (biomasy).

Mineralizácia: mineralizácia je úplná degradácia organickej chemikálie na CO_2 a H_2O v aeróbnych podmienkach a na CH_4, CO_2 a H_2O v anaeróbnych podmienkach.

Lag fáza: dosiahnutý čas od začiatku testu do aklimatizácie a/alebo prispôsobenia degradujúcich mikroorganizmov a do zvýšenia stupňa biodegradácie testovanej chemikálie alebo organického materiálu na úroveň stanoviteľnosti (napr. 10 % maximálnej teoretickej biodegradácie alebo menej v závislosti od presnosti meracej techniky).

Fáza degradácie: čas od konca lag fázy až po čas, keď sa dosiahne 90 % maximálnej úrovne degradácie.

Rovnovážna fáza: rovnovážna fáza je fáza, v ktorej sa dosiahla maximálna degradácia a v ktorej je krivka biodegradácie vyrovnaná.

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

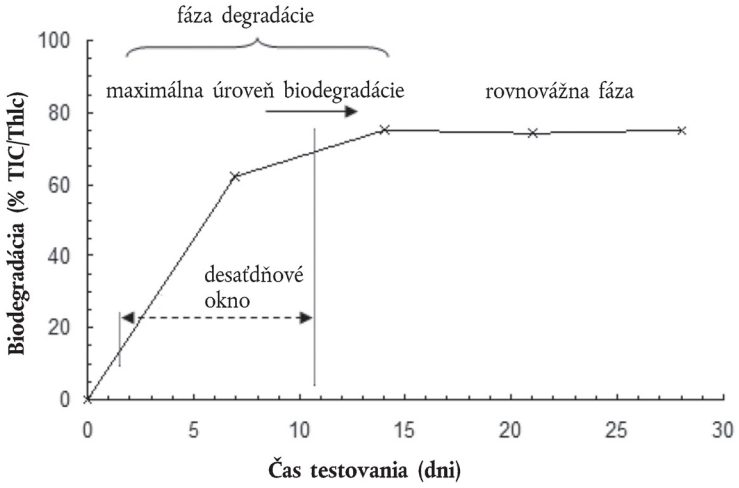
▼M4

Dodatok 2

Príklad krivky biodegradácie

Obrázok 1

Biodegradácia 1-oktanolu v teste CO_2 v uzavretom priestore nad kvapalinou



Glosár

Biodegradácia:

Fáza degradácie:

Maximálna úroveň biodegradácie:

Rovnovážna fáza:

Desaťdňové okno:

Čas testovania (dni):

▼M4

C. 30. **BIOAKUMULÁCIA PRI SUCHOZEMSKÝCH MÁLOŠTETINAVCOCH**

ÚVOD

1. Táto testovacia metóda je rovnocenná s Usmerneniami OECD na vykonávanie testov (TG) 317 (2010). Pokiaľ ide o testovacie metódy týkajúce sa environmentálneho osudu, Biokoncentrácia: prietokový rybí test [kapitola C.13 tejto prílohy (49)] bola uverejnená v roku 1996 a Bioakumulácia pri bentických máloštetinavcoch žijúcich v sedimente [kapitola C.51 tejto prílohy (53)] bola uverejnená v roku 2008. Extrapolácia údajov o vodnej bioakumulácii na suchozemské organizmy, ako sú dážďovky, je zložitá, resp. nemožná. Modelové výpočty založené na lipofilite testovanej chemikálie, napr. (14) (37), sa v súčasnosti využívajú na hodnotenie bioakumulácie chemikálií v pôde, ako napríklad v technickom usmerňovacom dokumente EÚ (19). Potrebe testovacej metódy špecifickej pre kompartmenty už bola venovaná pozornosť, napr. (55). Takáto metóda je dôležitá najmä pre hodnotenie sekundárnej otravy v suchozemských potravinových reťazcoch (4). Problému bioakumulácie v organizmoch iných ako ryby sa venuje niekoľko testovacích metód na vnútroštátnej úrovni, napr. (2) a (72). Metódu merania bioakumulácie pri dážďovkách a červoch čeľade *Enchytraeidae* (Eisenia fetida, Savigny) z kontaminovanej pôdy vypracovala Americká spoločnosť pre testovanie a materiály (American Society for Testing and Materials) (3). Medzinárodne uznávaná metóda na stanovenie bioakumulácie v obohatenej pôde prispeje k lepšiemu hodnoteniu rizík chemikálií v suchozemských ekosystémoch, napr. (25) (29).

2. Bezstavovce požívajúce pôdu sú vystavené účinkom chemikálií naviazaných na pôdu. Medzi týmito zvieratami zohrávajú suchozemské máloštetinavce významnú úlohu v štruktúre a funkcii pôdy (15) (20). Suchozemské máloštetinavce žijú v pôde a čiastočne na pôdnom povrchu (najmä v nadložnom horizonte). Často predstavujú najhojnejšie zastúpený živočíšny druh v biomase (54). Tieto zvieratá vzhľadom na bioturbáciu pôdy a skutočnosť, že bývajú častou korisťou, významne ovplyvňujú biodostupnosť chemikálií pre iné organizmy, ako sú dravce patriace do skupiny bezstavovcov [napr. dravé roztoče a chrobáky, napr. (64)] alebo stavovcov (napr. líšky a čajky) (18) (62). Niektoré druhy suchozemských máloštetinavcov, ktoré sa v súčasnosti využívajú v ekotoxikologickom testovaní, sú opísané v dodatku 5.

3. V štandardnej príručke ASTM na vykonávanie laboratórnych testov pôdnej toxicity alebo bioakumulácie pri dážďovkách druhu *Eisenia fetida* a červov čeľade *Enchytraeidae* druhu *Enchytraeus albidus* (3) sa uvádza mnoho základných a užitočných informácií týkajúcich sa postupu tejto testovacej metódy bioakumulácie v pôde. Medzi ďalšie dokumenty, ktoré sú uvedené v tejto testovacej metóde, patrí kapitola C.13 tejto prílohy, Biokoncentrácia: prietokový rybí test (49) a kapitola C.51 tejto prílohy: Bioakumulácia pri bentických máloštetinavcoch žijúcich v sedimente (53). Ďalší významný zdroj informácií o tejto testovacej metóde predstavujú aj praktické skúsenosti so štúdiami bioakumulácie v pôde a publikácie uvedené v literatúre, napr. (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) (79).

4. Túto testovaciu metódu možno použiť najmä v prípade stabilných, neutrálnych organických chemikálií, ktoré sa zvyčajne adsorbujú na pôde. Pomocou tejto testovacej metódy možno testovať bioakumuláciu stabilných organokovových zlúčenín, ktoré sa viažu na pôdu. Možno ju použiť aj na kovy a iné stopové prvky.

PREDPOKLADANÉ PODMIENKY

5. Testy na meranie bioakumulácie chemikálie pri suchozemských máloštetinavcoch boli vykonané s ťažkými kovmi [pozri napr. (63)] a perzistentnými, organickými chemikáliami s hodnotami log Kow od 3,0 do 6,0, napr. (40). Takéto testy sa vzťahujú aj na:

— chemikálie, ktoré vykazujú nízky log K_{ow} vyšší ako 6,0 (superhydrofóbne chemikálie),

▼M4

— chemikálie patriace do triedy organických chemikálií, o ktorých je známe, že majú potenciál sa bioakumulovať v živých organizmoch, napr. povrchovo aktívne alebo vysokoadsorpčné chemikálie,

— chemikálie, ktoré vykazujú potenciál bioakumulácie vzhľadom na štruktúrne charakteristiky, napr. analógy chemikálií, pri ktorých je známy potenciál bioakumulácie, a

— kovy.

6. Informácie o testovanej chemikálii, ako je bežný názov, chemický názov (podľa možnosti názov IUPAC), štrukturálny vzorec, registračné číslo CAS, čistota, bezpečnostné opatrenia, vhodné podmienky skladovania a analytické metódy, je potrebné získať pred začiatkom štúdie. Okrem toho je nutné poznať tieto informácie:

a) rozpustnosť vo vode;

b) rozdeľovací koeficient oktanol – voda, K_{ow};

c) rozdeľovací koeficient pôda – voda, vyjadrený ako K_{oc};

d) tlak pary;

e) degradovateľnosť (napr. v pôde, vo vode);

f) známe metabolity.

7. Možno použiť rádiooznačené testované chemikálie alebo chemikálie bez rádiooznačenia. Na uľahčenie analýzy sa však odporúča použiť rádiooznačenú testovanú chemikáliu. Rozhodnutie bude závisieť od detekčných limitov alebo od požiadavky na meranie materskej testovanej chemikálie a metabolitov. Ak sa použije rádiooznačená testovaná chemikália a merajú sa celkové rádioaktívne rezíduá, je dôležité, aby sa rádiooznačené rezíduá v pôde aj v testovacích organizmoch charakterizovali prostredníctvom určenia percenta materskej testovanej chemikálie a percenta označenej nematerskej chemikálie, napr. vo vzorkách odobratých v rovnovážnom stave alebo na konci fázy absorpcie, aby bolo možné vypočítať bioakumulačný faktor (BAF) pre danú materskú testovanú chemikáliu a pre metabolity v pôde (pozri odsek 50). Metódu, ktorá je tu opísaná, možno modifikovať, napr. na účely zabezpečenia dostatočnej biomasy, na meranie organickej testovanej chemikálie bez rádiooznačenia alebo v prípade kovov. Ak sa merajú celkové rádioaktívne rezíduá (prostredníctvom kvapalinovej scintilačnej spektroskopie nasledujúcej po extrakcii, horení alebo stabilizácii tkaniva), bioakumulačný faktor je založený na materskej testovanej chemikálii a metabolitoch. Výpočet BAF by podľa možnosti mal vychádzať z koncentrácie materskej testovanej chemikálie v organizmoch a celkových rádioaktívnych rezíduí. Následne sa na účely porovnateľnosti medzi výsledkami rôznych testov bioakumulácie na základe BAF vypočíta akumulačný faktor bioty k pôde (BSAF) normalizovaný na obsah lipidov v červoch a obsah organického uhlíka (OC) v pôde.

8. Toxicita testovanej chemikálie pre živočíšny druh použitý v teste by mala byť známa, napr. účinná koncentrácia (ECx) alebo letálna koncentrácia (LCx) počas fázy absorpcie [napr. (19)]. Vybratá koncentrácia testovanej chemikálie by podľa možnosti mala predstavovať približne 1 % jej akútnej asymptotickej LC_{50} a mala by byť najmenej desaťkrát vyššia ako jej detekčný limit v pôde pri použitej analytickej metóde. Prednostne by sa mali použiť hodnoty toxicity získané z dlhodobých štúdií o subletálnych parametroch, pokiaľ sú k dispozícii (51) (52). Ak takéto údaje nie sú dostupné, užitočné informácie prinesie test akútnej toxicity [pozri napr. (23)].

▼M4

9. Mala by byť k dispozícii vhodná analytická metóda známej správnosti, presnosti a citlivosti na kvantifikáciu chemikálie v testovacích roztokoch, v pôde a v biologickom materiáli, ako aj údaje o príprave a skladovaní vzoriek a karty bezpečnostných údajov o materiáli. Treba poznať aj analytické detekčné limity testovanej látky v pôde a v tkanivách červov. Ak sa použije testovaná chemikália označená 14C, je nutné poznať špecifickú rádioaktivitu (t. j. Bq mol^{-1}) a percento rádioaktivity spojenej s nečistotami. Špecifická rádioaktivita testovanej chemikálie by mala byť dostatočne vysoká, aby umožnila analýzu, a použité testovacie koncentrácie by nemali vyvolávať toxické účinky.

10. Test možno vykonať s využitím umelej alebo prírodnej pôdy. Informácie o charakteristikách použitej prírodnej pôdy, napr. pôvod pôdy alebo jej zložiek, pH, obsah organického uhlíka, rozdelenie veľkosti častíc (percento piesku, siltu a hliny), a retenčná kapacita vody (WHC) by mali byť známe pred začiatkom testu (3) (48).

PRINCÍP TESTU

11. Medzi parametre, ktoré charakterizujú bioakumuláciu testovanej chemikálie, patrí bioakumulačný faktor (BAF), konštanta rýchlosti absorpcie (k_s) a konštanta rýchlosti eliminácie (k_e). Vymedzenie pojmov je uvedené v dodatku 1.

12. Test pozostáva z dvoch fáz: fázy absorpcie (expozícia) a fázy eliminácie (po expozícii). Počas fázy absorpcie sa paralelné skupiny červov vystavia pôsobeniu pôdy, ktorá bola obohatená testovanou chemikáliou. Okrem testovacích zvierat sa za tých istých podmienok bez testovanej chemikálie chovajú skupiny kontrolných červov. Odmeria sa suchá hmotnosť a obsah lipidov v testovacích organizmoch. Na toto meranie možno použiť červy z kontrolnej skupiny. Analytické hodnoty pozadia (slepý test) možno získať analýzou vzoriek kontrolných červov a pôdy. Vo fáze eliminácie sa červy prenesú do pôdy, ktorá neobsahuje testovanú chemikáliu. Fáza eliminácie je nutná vždy okrem prípadu, keď je absorpcia testovanej chemikálie počas fázy expozície bezvýznamná. Fáza eliminácie poskytuje informácie o rýchlosti, ktorou testovacie organizmy vylučujú testovanú chemikáliu [napr. (27)]. Ak sa v priebehu fázy absorpcie nedosiahol rovnovážny stav, stanovenie kinetických parametrov – kinetického bioakumulačného faktora BAFk, konštánt rýchlosti absorpcie a eliminácie – by podľa možnosti malo byť založené na súbežnej úprave výsledkov z fáz absorpcie a eliminácie. Koncentrácia testovanej chemikálie v/na červoch sa monitoruje v priebehu oboch fáz testu.

13. Počas fázy absorpcie sa vykonávajú merania v časoch odberov vzoriek počas až 14 dní (čeľaď *Enchytraeidae*) alebo 21 dní (dážďovky), až kým sa nedosiahne rovnovážny stav (11) (12) (67). Rovnovážny stav nastáva vtedy, keď je krivka závislosti koncentrácie pri červoch od času paralelná s časovou osou a ak sa tri po sebe nasledujúce analýzy vzoriek odobratých v intervaloch najmenej dvoch dní navzájom nelíšia o viac ako ± 20 % na základe štatistických porovnaní (napr. analýza rozptylu, regresná analýza).

14. Fáza eliminácie pozostáva z prenosu testovacích organizmov do nádob obsahujúcich rovnaký substrát bez testovanej chemikálie. Počas fázy eliminácie sa merania vykonávajú v časoch odberov vzoriek počas 14 dní (čeľaď *Enchytraeidae*) alebo 21 dní (dážďovky), pokiaľ skoršie analytické skúmanie nepreukázalo 90-percentné zníženie rezíduí testovanej chemikálie pri červoch. Koncentrácia testovanej chemikálie pri červoch na konci fázy

▼M4

eliminácie sa do správy uvedie ako neeliminované rezíduá. Rovnovážny bioakumulačný faktor (BAFss) sa podľa možnosti vypočíta ako pomer koncentrácie pri červoch (Ca) a v pôde (Cs) pri zrejmom rovnovážnom stave, a ako kinetický bioakumulačný faktor, BAFK, ako pomer konštanty rýchlosti absorpcie z pôdy (ks) a konštanty rýchlosti eliminácie (ke) (pre vymedzenie pojmov pozri dodatok 1) pri predpoklade kinetiky prvého rádu (pre výpočty pozri dodatok 2). Ak je zrejmé, že nie je možné použiť kinetiku prvého rádu, mali by sa použiť iné modely.

15. Konštanta rýchlosti absorpcie, konštanta rýchlosti eliminácie (alebo konštanty, ak boli použité ďalšie modely), kinetický bioakumulačný faktor (BAFK) a podľa možnosti limity spoľahlivosti každého z týchto parametrov sa vypočítajú pomocou počítačových modelových rovníc (pre ďalšie usmernenia pozri dodatok 2). Správnosť odhadu každého modelu možno stanoviť napr. na základe korelačného koeficientu alebo koeficientu určenia (koeficienty blízke hodnote jeden indikujú vysokú mieru zhody) alebo na základe chí-kvadrátu. Takisto veľkosť štandardnej chyby alebo limit spoľahlivosti blízko odhadovaných parametrov môžu indikovať správnosť odhadu modelu.

16. Na zníženie variability výsledkov testu v prípade testovaných chemikálií s vysokou lipofilitou by bioakumulačné faktory mali byť vyjadrené vo vzťahu k obsahu lipidov a k obsahu organického uhlíka (kg organického uhlíka (OC) kg^{-1} obsahu lipidov pri červoch). Tento prístup je založený na skutočnosti, že v prípade iektorých chemických tried existuje zrejmá závislosť medzi potenciálom bioakumulácie a lipofilitou, ktorá bola zistená pri rybách (47). Medzi obsahom lipidov pri rybách a bioakumuláciou takýchto chemikálií existuje vzťah. V prípade bentických organizmov boli zistené podobné korelácie, napr. (30) (44). Podobne sa táto korelácia preukázala v prípade suchozemských máloštetinavcov, napr. (5) (6) (7) (14). Ak je k dispozícii dostatok ntkaniva z červov, obsah lipidov v testovacích zvieratách možno určiť na rovnakom biologickom materiáli, aký bol použitý na určenie koncentrácie testovanej chemikálie. Na meranie obsahu lipidov možno prípadne použiť kontrolné zvieratá.

PLATNOSŤ TESTU

17. Ak má byť test platný, musia byť splnené tieto kritériá v prípade kontrolných zvierat, ako aj v prípade ošetrených zvierat:

— na konci testu by celková mortalita počas fázy absorpcie a eliminácie nemala presahovať 10 % (dážďovky) alebo 20 % (červy čeľade *Enchytraeidae*) celkového počtu zavedených červov,

— pri druhoch *Eisenia fetida* a *Eisenia andrei* by strata strednej hmotnosti nameraná na konci fázy absorpcie a na konci fázy eliminácie nemala presahovať 20 % v porovnaní s počiatočnou čerstvou hmotnosťou (f.w.) na začiatku jednotlivých fáz.

OPIS METÓDY

Testovacie druhy

18. Na testovanie bioakumulácie sa odporúča niekoľko druhov suchozemských máloštetinavcov. Najbežnejšie používané druhy *Eisenia fetida* alebo *Eisenia andrei* (čeľaď *Lumbricidae*), alebo *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus cryptícus* alebo *Enchytraeus luxuriosus* (čeľaď *Enchytraeidae*) sú opísané v dodatku 5.

▼M4

Zariadenie

19. V prípade všetkých častí zariadenia treba dbať na to, aby sa predišlo používaniu materiálov, ktoré môžu rozpustiť, adsorbovať testovanú chemikáliu alebo vylúhovať iné chemikálie a mať škodlivé účinky na testovacie zvieratá. Možno použiť štandardné nádoby pravouhlého alebo valcovitého tvaru vyrobené z chemicky inertného materiálu a s primeranou kapacitou, ktorá zodpovedá veľkosti násady, t. j. počtu testovacích červov. Na každé zariadenie, ktoré prichádza do kontaktu s testovacími médiami, možno použiť nerezovú oceľ, umelú hmotu alebo sklo. Testovacie nádoby by mali byť vhodne prikryté, aby sa zabránilo úniku červov, ale zároveň bol zabezpečený dostatočný prívod vzduchu. V prípade chemikálií s vysokým adsorpčným koeficientom, ako sú syntetické pyretroidy, môže byť potrebné posilanizované sklo. V takýchto prípadoch je potrebné zariadenia po skončení pokusu zlikvidovať (49). Je nutné zabrániť úniku rádiooznačených testovaných látok a prchavých chemikálií. Na zachytenie všetkých rezíduí odparených z testovacích nádob by sa mali použiť zachytávače (napr. sklenené fľaše na premývanie plynu) obsahujúce vhodné absorbenty.

Pôda

20. Testovacia pôda by mala mať takú kvalitu, aby umožnila prežívanie a podľa možnosti reprodukciu testovacích organizmov počas celého obdobia aklimatizácie a testovania bez toho, aby sa pri týchto organizmoch prejavil nezvyčajný vzhľad alebo správanie. Červy by sa mali zahrabať do pôdy.

21. Ako substrát v týchto testoch sa odporúča použiť umelú pôdu opísanú v kapitole C.8 tejto prílohy (48). Príprava umelej pôdy pre testy bioakumulácie a odporúčania týkajúce sa skladovania umelej pôdy sú uvedené v dodatku 4. Umelú pôdu vysušenú vzduchom možno až do použitia skladovať pri izbovej teplote.

22. Ako testovacia a/alebo kultivačná pôda však môže slúžiť prírodná pôda z neznečistených miest. V prípade prírodnej pôdy je nutné uviesť aspoň pôvod (miesto odberu), pH, obsah organického uhlíka, rozdelenie veľkosti častíc (percento piesku, siltu a hliny), maximálnu retenčnú kapacitu vody (WHCmax) a percentuálny obsah vody (3). Analýzou pôdy alebo jej zložiek pred použitím možno získať užitočné informácie o znečisťujúcich mikrolátkach. Ak sa použije pôda z poľnohospodárskeho poľa, nemala by byť ošetrovaná výrobkami na ochranu plodín ani hnojivom z ošetrovaných zvierat, ako sú umelé hnojivá, najmenej jeden rok a v prípade organických hnojív najmenej šesť mesiacov pred odberom vzoriek (50). Postupy manipulácie s prírodnou pôdou pred jej použitím v ekotoxikologických testoch s máloštetinavcami v laboratóriu sú opísané v odseku (3). Čas skladovania prírodnej pôdy v laboratóriu by mal byť čo najkratší.

Aplikácia testovanej chemikálie

23. Testovaná chemikália sa pridá do pôdy. Je potrebné zohľadniť fyzikálno-chemické vlastnosti testovanej chemikálie. Testovaná chemikália rozpustná vo vode by sa mala pred tým, ako sa zmieša s pôdou, vo vode úplne rozpustiť. Odporúčaný postup obohacovania v prípade testovanej chemikálie, ktorá je slabo rozpustná vo vode, zahŕňa nanesenie testovanej chemikálie na jednu alebo viacero (umelých zložiek) pôdy. Napríklad kremenný piesok alebo jeho časť možno napustiť roztokom testovanej chemikálie vo vhodnom organickom rozpúšťadle, ktorý sa následne odparí do sucha. a Časť s nánosom možno potom zamiešať do mokrej pôdy. Hlavnou výhodou tohto postupu je fakt, že do pôdy sa nedostane žiadne rozpúšťadlo.

▼M4

Ak sa použije prírodná pôda, testovanú chemikáliu možno pridať obohatením časti pôdy vysušenej vzduchom, ako je opísané v prípade umelej pôdy, alebo zamiešaním testovanej chemikálie do mokrej pôdy, pričom ďalším krokom bude odparenie v prípade, že sa použilo činidlo zvyšujúce rozpustnosť. Vo všeobecnosti treba v čo najväčšej možnej miere zabrániť kontaktu mokrej pôdy s rozpúšťadlami. Je možné uvažovať o nasledujúcich možnostiach (3):

— ak sa použije iné rozpúšťadlo ako voda, malo by byť miešateľné s vodou a/alebo by malo byť možné ho odstrániť (napríklad odparením), v dôsledku čoho by v pôde zostala iba testovaná chemikália,

— ak sa použije kontrola rozpúšťadla, negatívna kontrola nie je nutná. Kontrola rozpúšťadla by mala obsahovať najvyššiu koncentráciu rozpúšťadla pridaného do pôdy a malo by sa pri nej použiť rozpúšťadlo z tej istej dávky, aká bola použitá na prípravu zásobného roztoku. Toxicita a prchavosť rozpúšťadla a rozpustnosť testovanej chemikálie vo vybratom rozpúšťadle by mali byť hlavnými kritériami pri výbere vhodného činidla zvyšujúceho rozpustnosť.

24. V prípade chemikálií, ktoré sú slabo rozpustné vo vode a v organických rozpúšťadlách, možno na dosiahnutie želanej testovacej koncentrácie zmiešať 2,0 – 2,5 g jemného kremenného piesku na testovaciu nádobu s určitým množstvom testovanej chemikálie, napr. pomocou trecej misky a paličky. Táto zmes kremenného piesku a testovanej chemikálie sa pridá do predvlhčenej pôdy a dôkladne sa zmieša s primeraným množstvom deionizovanej vody, aby sa získal požadovaný obsah vlhkosti. Konečná zmes sa rozdelí do testovacích nádob. Postup sa opakuje pri každej testovacej koncentrácii a pripraví sa aj vhodná kontrola s 2,0 – 2,5 g jemne zomletého kremenného piesku na testovaciu nádobu.

25. Koncentrácia testovanej chemikálie v pôde sa stanoví po obohatení. Pred zavedením testovacích organizmov je potrebné overiť homogénnu distribúciu testovanej chemikálie do pôdy. Metóda použitá na obohatenie a dôvody pre výber konkrétneho postupu obohacovania sa uvedú do správy (24).

26. Rovnováha medzi pôdnou fázou a fázou pórovej vody by sa podľa možnosti mala stanoviť ešte pred pridaním organizmov. Odporúča sa použiť obdobie štyroch dní pri teplote 20 °C. V prípade mnohých organických chemikálií slabo rozpustných vo vode sa čas potrebný na dosiahnutie skutočnej rovnováhy medzi adsorbovanými a rozpustenými časťami môže počítať na dni alebo mesiace. V závislosti od účelu štúdie, napríklad ak sa napodobňujú podmienky životného prostredia, sa obohatená pôda môže nechať „zrieť“ dlhšie, napr. v prípade kovov počas troch týždňov pri teplote 20 °C (22).

Kultivácia testovacích organizmov

27. Červy sa podľa možnosti chovajú v stálej laboratórnej kultúre. Usmernenia o metódach laboratórnej kultivácie v prípade druhov *Eisenia fetida* a *Eisenia andrei* a druhov čeľade *Enchytraeidae* sú uvedené v dodatku 5 [pozri aj (48) (51) (52)].

28. Červy použité v testoch by nemali mať žiadne badateľné choroby, abnormality a parazity.

VYKONANIE TESTU

29. Testovacie organizmy sú počas fázy absorpcie vystavené pôsobeniu testovanej chemikálie. Fáza absorpcie by mala trvať 14 dní (*Enchytraeidae*) alebo 21 dní (dážďovky), pokiaľ sa nepreukáže, že bol dosiahnutý rovnovážny stav.

▼M4

30. Vo fáze eliminácie sa červy prenesú do pôdy, ktorá neobsahuje testovanú chemikáliu. Prvá vzorka sa odoberie po 4 – 24 hodinách od začiatku fázy eliminácie. Príklady harmonogramu odberov vzoriek v prípade 21-dňovej fázy absorpcie a 21-dňovej fázy eliminácie sú uvedené v dodatku 3.

Testovacie organizmy

31. V prípade mnohých druhov suchozemských červov čeľade *Enchytraeidae* je individuálna hmotnosť veľmi nízka (napr. 5 – 10 mg čerstvej hmotnosti na jedinca v prípade druhu *Enchytraeus albidus* a ešte menej v prípade druhu *Enchytraeus crypticus* alebo *Enchytraeus luxuriosus*). Na vykonanie meraní hmotnosti a chemickú analýzu môže byť potrebné zozbierať červy z paralelných testovacích nádob (t. j. na získanie jedného analytického výsledku z tkaniva sa použijú všetky červy z paralelnej nádoby). Do každého replikátu sa pridá 20 jedincov *Enchytraeidae*, pričom sa použijú najmenej tri replikáty. Ak je analytický detekčný limit testovanej chemikálie vysoký, môže byť potrebných viac červov. V prípade testovacích druhov s vyššou individuálnou hmotnosťou (*Eisenia fetida* a *Eisenia andrei*) možno použiť paralelné nádoby obsahujúce jedného jedinca.

32. Dážďovky použité v teste by mali mať podobnú hmotnosť (napr. individuálna hmotnosť *Eisenia fetida* a *Eisenia andrei* by mala byť v rozmedzí 250 – 600 mg). Červy čeľade *Enchytraeidae* (napr. *Enchytraeus albidus*) by mali mať dĺžku približne 1 cm. Všetky červy použité v konkrétnom teste by mali pochádzať z rovnakého zdroja a malo by ísť o dospelé zvieratá s klitelom (pozri dodatok 5). Keďže hmotnosť a vek zvieraťa môže mať vplyv na hodnoty BAF (napr. v dôsledku meniaceho sa obsahu lipidov a/alebo prítomnosti vajíčok), tieto parametre je nutné presne zaznamenať a zohľadniť pri interpretácii výsledkov. Okrem toho počas obdobia expozície môže dôjsť k nakladeniu kokónov, čo bude mať takisto vplyv na hodnoty BAF. Pred testom sa odporúča odvážiť podvzorku testovacích červov na odhadnutie strednej čerstvej a suchej hmotnosti.

33. Používa sa vysoký pomer pôdy k červom, aby sa minimalizovalo znižovanie koncentrácie testovanej chemikálie v pôde počas fázy absorpcie. V prípade druhov *Eisenia fetida* a *Eisenia andrei* je minimálne odporúčané množstvo 50 g suchej hmotnosti (d.w.) pôdy na červa a v prípade červov čeľade *Enchytraeidae* minimálne 10 – 20 g d.w. pôdy na testovaciu nádobu. Nádoby by mali obsahovať vrstvu pôdy hrubú 2 – 3 cm (*Enchytraeidae*) alebo 4 – 5 cm (dážďovky).

34. Červy použité v teste sa odoberú z kultúry (napr. červy *Enchytraeidae* pomocou pinzety). Dospelé zvieratá sa prenesú do neošetrenej testovacej pôdy, aby sa aklimatizovali, a kŕmia sa (pozri odsek 36). Ak sa podmienky testovania líšia od podmienok kultivácie, fáza aklimatizácie v trvaní 24 – 72 hodín by mala postačovať, aby sa červy adaptovali na podmienky testovania. Po aklimatizácii sa dážďovky prepláchnu tak, že sa prenesú do sklenených misiek (napr. Petriho misiek) obsahujúcich čistú vodu a následne sa odvážia pred tým, ako sa vložia do testovacej pôdy. Pred vážením treba z červov odstrániť nadbytočnú vodu jemným dotykom o hranu misky alebo opatrným osušením mierne navlhčenou papierovou vreckovkou.

35. Zahrabávanie testovacích organizmov sa pozoruje a zaznamená. V testoch s dážďovkami sa zvieratá (kontrolné a ošetrené) zvyčajne zahrabú do pôdy za niekoľko hodín, čo treba najneskôr do 24 hodín po pridaní červov do testovacích nádob skontrolovať. Ak sa dážďovky nezahrabú do pôdy (napr. viac ako 10 % v priebehu vyše polovice fázy absorpcie), znamená to buď, že podmienky testovania nie sú vhodné, alebo že testovacie organizmy nie

▼M4

sú zdravé. V takom prípade je potrebné test pozastaviť a zopakovať. Červy *Enchytraeidae* žijú najmä v intersticiálnych póroch pôdy a ich integument môže byť často v kontakte s okolitým substrátom iba čiastočne. Predpokladá sa, že expozícia zahrabávajúcich sa a nezahrabávajúcich sa červov *Enchytraeidae* je rovnaká a v prípade, že sa červy nezahrabú, nie je nevyhnutne potrebné test opakovať.

Kŕmenie

36. Ak sa použije pôda s nízkym celkovým obsahom organického uhlíka, je potrebné naplánovať kŕmenie. Ak sa použije umelá pôda, odporúčaná týždenná dávka krmiva (t. j. červy sa kŕmia raz týždenne) je 7 mg sušeného hnoja na g suchej hmotnosti pôdy v prípade dážďoviek a 2 – 2,5 mg zomletých ovsených vločiek na g suchej hmotnosti pôdy v prípade červov *Enchytraeidae* (11). Prvá dávka potravy sa zmieša s pôdou tesne pred pridaním testovacích organizmov. Podľa možnosti sa použije rovnaký druh potravy, aký sa použil v kultúrach (pozri dodatok 5).

Svetlo a teplota

37. Testy sa vykonávajú v kontrolovaných 16/8-hodinových cykloch svetla/tmy, podľa možnosti s intenzitou 400 – 800 lx v priestore testovacích nádob (3). Testovacia teplota by počas celého testu mala byť 20 ± 2 °C.

Testovacie koncentrácie

38. Použije sa jedna koncentrácia. Prípady, keď je potrebná ďalšia koncentrácia (koncentrácie), treba odôvodniť. Ak sa toxicita (ECx) testovanej chemikálie blíži k analytickému detekčnému limitu, na testovanie sa odporúča sa použiť rádiooznačenú chemikáliu s vysokou špecifickou rádioaktivitou. V prípade kovov by koncentrácia mala byť vyššia ako úroveň pozadia v tkanive a pôde.

Replikáty

39. Na kinetické merania (fáza absorpcie a eliminácie) sa pri každom odbere vzorky použijú minimálne tri ošetrené paralelné nádoby. Celkový počet pripravených replikátov by mal byť dostatočný na pokrytie všetkých časov odberu vzoriek vo fáze absorpcie a eliminácie.

40. Na účely biologických pozorovaní a meraní (napr. pomer suchej a čerstvej hmotnosti, obsahu lipidov) a na analýzu koncentrácií v pozadí pri červoch a v pôde musí byť v prípade, že sa nepoužilo iné rozpúšťadlo ako voda, k dispozícii najmenej 12 paralelných nádob negatívnej kontroly (zo štyroch sa vzorka odoberie na začiatku, zo štyroch na konci fázy absorpcie a zo štyroch na konci fázy eliminácie). Ak sa pri aplikácii testovanej chemikálie použije činidlo zvyšujúce rozpustnosť, okrem ošetrených replikátov treba vykonať kontrolu rozpúšťadla (zo štyroch paralelných nádob sa vzorka odoberie na začiatku, zo štyroch na konci fázy absorpcie a zo štyroch na konci fázy eliminácie) obsahujúcu všetky zložky okrem testovanej látky. V tomto prípade možno na nepovinný odber vzorky na konci fázy absorpcie použiť ďalšie štyri paralelné nádoby na negatívnu kontrolu (bez rozpúšťadla). Tieto replikáty možno biologicky porovnať s kontrolou rozpúšťadla s cieľom získať informácie o možnom vplyve rozpúšťadla na testovacie organizmy. Odporúča sa založenie dostatočného počtu ďalších rezervných paralelných nádob (napr. osem) na aplikáciu látky a kontrolu.

▼M4

Frekvencia merania kvality pôdy

41. Hodnota pH pôdy, obsah vlhkosti pôdy a teplota (nepretržitá) v testovacej miestnosti sa odmerajú na začiatku a na konci fázy absorpcie a eliminácie. Raz týždenne sa obsah vlhkosti pôdy skontroluje odvážením testovacích nádob a porovnaním skutočných hmotností s počiatočnými hmotnosťami na začiatku testu. Straty vody treba kompenzovať pridávaním deionizovanej vody.

Odber vzoriek a analýza červov a pôdy

42. Príklad harmonogramu fázy absorpcie a fázy eliminácie v testoch bioakumulácie pri dážďovkách a *Enchytraeidae* je uvedený v dodatku 3.

43. Vzorky pôdy sa z testovacích nádob na účely stanovenia koncentrácie testovanej chemikálie odoberú pred pridaním červov a počas fázy absorpcie a fázy eliminácie. V priebehu testu sa stanovia koncentrácie testovanej chemikálie v červoch a v pôde. Vo všeobecnosti sa merajú celkové koncentrácie pôdy. Nepovinne možno odmerať koncentrácie v pórovej vode. V takom prípade je nutné pred začiatkom štúdie uviesť odôvodnenie a príslušné metódy a zahrnúť ich do správy.

44. Vzorky červov a pôdy sa počas fázy absorpcie a fázy eliminácie odoberú najmenej šesťkrát. Ak sa preukáže stabilita testovanej chemikálie, počet analýz pôdy možno znížiť. Odporúča sa analyzovať najmenej tri replikáty na začiatku a na konci fázy absorpcie. Ak sa koncentrácia v pôde nameraná na konci fázy absorpcie líši od počiatočnej koncentrácie o viac ako 30 %, treba analyzovať aj vzorky pôdy odobraté v iné dni.

45. Červy z daného replikátu sa z pôdy pri každom čase odberu vzorky vyberú (napr. sa na plytkú misku rozotrie pôda z replikátu a červy sa povyberajú pomocou jemnej pinzety) a rýchlo sa prepláchnu vodou v plytkom pohári alebo oceľovej miske. Nadbytočná voda sa odstráni (pozri odsek 34). Červy sa opatrne prenesú do predváženej nádoby a okamžite sa odvážia vrátane obsahu tráviaceho traktu.

46. V prípade dážďoviek (druh *Eisenia*) sa počká jednu noc na vyprázdnenie tráviaceho traktu červov, napr. sa umiestnia na vlhký filtračný papier do prikrytej Petriho misky (pozri odsek 34). Po vyprázdnení sa stanoví hmotnosť červov, aby sa posúdilo možné zníženie biomasy počas testu (pozri kritériá platnosti v odseku 17). Váženie a analýza tkaniva sa v prípade *Enchytraeidae* vykonáva bez vyprázdňovania, lebo je to vzhľadom na malú veľkosť týchto červov technicky náročné. Po stanovení konečnej hmotnosti sa červy okamžite najvhodnejšou metódou usmrtia (napr. pomocou tekutého dusíka alebo zmrazením pri teplotách pod – 18 °C).

47. Vo fáze eliminácie červy nahradia kontaminovaný obsah tráviaceho traktu čistou pôdou. To znamená, že merania pri nevyprázdnených červoch (v tomto kontexte *Enchytraeidae*), z ktorých sa vzorky odoberali tesne pred fázou eliminácie, obsahujú kontaminovanú pôdu v tráviacom trakte. Pri vodných máloštetinavcoch sa predpokladá, že po prvých 4 – 24 hodinách fázy eliminácie sa väčšina kontaminovaného obsahu tráviaceho traktu nahradí čistým sedimentom, napr. (46). Podobné zistenia boli zaznamenané aj pri dážďovkách v štúdiách akumulácie rádiooznačeného kadmia a zinku (78). Pri nevyprázdnených *Enchytraeidae* možno koncentráciu tejto prvej vzorky fázy eliminácie považovať za koncentráciu v tkanive po vyprázdnení tráviaceho traktu. Na zohľadnenie zriedenia koncentrácie testovanej látky nekontaminovanou pôdou počas fázy eliminácie možno hmotnosť obsahu tráviaceho traktu odhadnúť na základe pomeru čerstvej hmotnosti a hmotnosti popola alebo pomeru suchej hmotnosti a hmotnosti popola pri červoch.

▼M4

48. Vzorky pôdy a červov by sa podľa možnosti mali analyzovať ihneď po odobratí (t. j. do jedného až dvoch dní), aby sa predišlo degradácii alebo iným stratám, pričom sa odporúča vypočítať približnú rýchlosť absorpcie a rýchlosť eliminácie v priebehu testu. Ak sa analýza odloží, vzorky by sa mali vhodnou metódou uskladniť, napr. hlbokým zmrazením (≤ – 18 °C).

49. Treba skontrolovať, či presnosť a reprodukovateľnosť chemickej analýzy, ako aj výťažnosť testovanej chemikálie zo vzoriek pôdy a červov vyhovujú danej metóde. V správe sa uvedie extrakčná účinnosť, detekčný limit (LOD) a kvantifikačný limit (LOQ). Podobne treba skontrolovať, či testovaná chemikália nie je prítomná v kontrolných nádobách vo vyšších koncentráciách, ako je koncentrácia v pozadí. Ak je koncentrácia testovanej chemikálie v testovacom organizme Ca pri kontrolných červoch > 0, treba túto skutočnosť pri výpočte kinetických parametrov zohľadniť (pozri dodatok 2). So všetkými vzorkami by sa počas celého testu malo zaobchádzať tak, aby sa minimalizovala kontaminácia a strata (napr. v dôsledku adsorpcie testovanej chemikálie na zariadenie na odber vzoriek).

50. Pri práci s rádiooznačenými testovanými chemikáliami sa môže analyzovať materská chemikália a metabolity. Kvantifikáciou materskej testovanej chemikálie a metabolitov v rovnovážnom stave alebo na konci fázy absorpcie sa získajú dôležité informácie. Vzorky by sa následne mali vyčistiť, aby bolo možné kvantifikovať materskú testovanú chemikáliu samostatne. Ak v analyzovanej vzorke (vzorkách) samotné metabolity presahujú 10 % celkovej rádioaktivity, odporúča sa identifikovať tieto metabolity.

51. Celková výťažnosť a výťažnosť testovanej chemikálie v červoch, v pôde a, ak sa použijú, v zachytávačoch obsahujúcich absorbenty na zadržanie odparenej testovanej chemikálie sa zaznamená a uvedie do správy.

52. Spájanie vzoriek jedincov odobratých z danej testovacej nádoby je prípustné v prípade červov *Enchytraeidae*, ktoré sú menšie ako dážďovky. Ak spájanie vzoriek vedie k zníženiu počtu replikátov, štatistické postupy, ktoré možno použiť pri spracúvaní údajov, budú obmedzenejšie. Ak sa vyžaduje špecifický štatistický postup a významnosť, potom je potrebné do testu zahrnúť primeraný počet paralelných testovacích nádob, aby sa zabezpečilo želané spájanie vzoriek, postup a významnosť.

53. Odporúča sa vyjadriť BAF ako funkciu celkovej suchej hmotnosti a v prípade potreby (t. j. v prípade vysokohydrofóbnych chemikálií) aj ako funkciu obsahu lipidov. Na stanovenie obsahu lipidov sa použijú vhodné metódy (niektoré existujúce metódy – napr. (31) (58) – je potrebné na tento účel upraviť). Tieto metódy využívajú extrakciu zmesou chloroformu a metanolu. S cieľom predísť použitiu chlórovaných rozpúšťadiel by sa mala použiť upravená metóda podľa Bligha a Dyera (9) uvedená v odkaze (17). Keďže rôznymi metódami sa nemusí dospieť k identickým hodnotám, je dôležité uviesť podrobné informácie o použitej metóde. Ak je to možné, t. j. ak je k dispozícii dostatočné množstvo tkaniva z červov, analýza lipidov by sa podľa možnosti mala vykonať na rovnakej vzorke alebo extrakte, aké boli použité na analýzu testovanej chemikálie, lebo lipidy je často nutné z extraktu odstrániť, skôr než ich možno chromatograficky analyzovať (49). Prípadne možno použiť kontrolné zvieratá na meranie obsahu lipidov, ktorý sa následne môže použiť na normalizáciu hodnôt BAF. Pri druhom prístupe je kontaminácia zariadenia testovanou chemikáliou nižšia.

▼M4

ÚDAJE A PODÁVANIE SPRÁV

Spracovanie výsledkov

54. Krivka absorpcie testovanej chemikálie sa získa tak, že sa na aritmetické osi zakreslí jej koncentrácia v/na červoch počas fázy absorpcie v závislosti od času. Ak krivka dosiahne rovnováhu alebo rovnovážny stav (pozri vymedzenie pojmov v dodatku 1), rovnovážny bioakumulačný faktor BAFss sa vypočíta podľa tohto vzorca:

$$\frac{C_a \text{ vrovnovážnom stave alebo na konci fázy absorpcie (stredná)}}{C_s \text{ v rovnovážnom stave alebo na konci fázy absorpcie (stredná)}}$$

C_a je koncentrácia testovanej chemikálie v testovacom organizme,

C_s je koncentrácia testovanej chemikálie v pôde.

55. Ak sa nedosiahne rovnovážny stav, namiesto BAFss sa na základe konštánt rýchlosti určí BAFK týmto spôsobom:

— určí sa akumulačný faktor (BAF_K) ako pomer k_s/k_e,

— rýchlosti absorpcie a eliminácie sa podľa možnosti vypočítajú súbežne (pozri rovnicu 11 v dodatku 2),

— konštanta rýchlosti eliminácie (k_e) sa zvyčajne stanoví podľa krivky eliminácie (t. j. znázornenia koncentrácie testovanej látky v červoch počas fázy eliminácie). Konštanta rýchlosti absorpcie k_s sa potom vypočíta podľa k_e a hodnoty C_a, ktorá je odvodená z krivky absorpcie (opis týchto metód je uvedený v dodatku 2). Prednostným spôsobom stanovovania BAF_K a oboch rýchlostných konštánt k_s a k_e sú nelineárne metódy odhadovania parametrov pomocou počítača. Ak je zrejmé, že eliminácia nie je prvého rádu, potom je potrebné použiť komplexnejšie modely.

Správa o teste

56. Správa o teste musí obsahovať tieto informácie:

Testovaná chemikália:

— všetky dostupné informácie o akútnej alebo dlhodobej toxicite (napr. EC_x, LC_x, NOEC) testovanej chemikálie pre máloštetinavce žijúce v pôde,

— čistota, fyzický charakter a fyzikálno-chemické vlastnosti, napr. log K_{ow}, rozpustnosť vo vode,

— chemické identifikačné údaje; zdroj testovanej látky, identita a koncentrácia akéhokoľvek použitého rozpúšťadla,

— ak sa použije rádiooznačená testovaná chemikália, presná poloha označených atómov, špecifická rádioaktivita a rádiochemická čistota.

Testovacie druhy:

— vedecký názov, kmeň, pôvod, všetky zásahy uskutočnené pred pokusom, aklimatizácia, vek, rozsah hmotností atď.

▼M4

Podmienky testovania:

— použitý postup testovania,

— typ a charakteristiky osvetlenia a dĺžka svetlej fázy (svetlých fáz),

— koncepcia testu (napr. počet a veľkosť testovacích nádob, hmotnosť pôdy a výška vrstvy pôdy, počet replikátov, počet červov v jednom replikáte, počet testovacích koncentrácií, trvanie fázy absorpcie a fázy eliminácie, frekvencia odberov vzoriek),

— odôvodnenie výberu materiálu testovacej nádoby,

— metóda prípravy a aplikácie testovanej látky, ako aj dôvody pre výber špecifickej metódy,

— nominálne testovacie koncentrácie, priemery hodnôt nameraných v testovacích nádobách a ich smerodajné odchýlky a spôsob, akým sa vypočítali,

— zdroj zložiek umelej pôdy alebo – ak boli použité prírodné médiá – pôvod pôdy, opis všetkých zásahov uskutočnených pred pokusom, výsledky kontrol (prežívanie, tvorba biomasy, reprodukcia), charakteristiky pôdy (pH, celkový obsah organického uhlíka, rozdelenie veľkosti častíc (percento piesku, siltu a hliny), WHC_{max}, percentuálny obsah vody na začiatku a na konci testu a akékoľvek iné uskutočnené merania),

— podrobné informácie o manipulácii so vzorkami pôdy a červov vrátane údajov o príprave, skladovaní, postupoch obohacovania, extrakcii a analytických postupoch (a presnosti) testovanej látky v červoch a v pôde, obsahu lipidov (ak sa meral) a výťažnosti testovanej látky.

Výsledky:

— mortalita kontrolných červov a červov v jednotlivých testovacích nádobách a akékoľvek pozorované nezvyčajné správanie (napr. vyhýbanie sa pôde, chýbajúca reprodukcia v teste bioakumulácie pri *Enchytraeidae*),

— pomer suchej hmotnosti k čerstvej hmotnosti pôdy a testovacích organizmov (užitočné na účely normalizácie),

— čerstvé hmotnosti červov v každom čase odberu vzorky; v prípade dážďoviek, čerstvé hmotnosti na začiatku testu a v každom čase odberu vzorky pred a po vyprázdnení tráviaceho traktu,

— obsah lipidov v testovacích organizmoch (ak bol stanovený),

— krivky znázorňujúce absorpčnú a eliminačnú kinetiku testovanej chemikálie pri červoch a v čase rovnovážneho stavu,

— C_a a C_s (so smerodajnou odchýlkou a rozsahom, ak je to vhodné) pre všetky časy odberov vzoriek (C_a vyjadrené v g kg^{-1} čerstvej a suchej hmotnosti celého tela, C_s vyjadrená v g kg^{-1} čerstvej a suchej hmotnosti pôdy). Ak sa požaduje akumulačný faktor bioty k pôde (BSAF) (napr. na porovnanie výsledkov z dvoch alebo viacerých testov vykonaných so zvieratami s odlišným obsahom lipidov), C_a možno dodatočne vyjadriť ako g kg^{-1} obsahu lipidov v organizme a C_s možno vyjadriť ako g kg^{-1} organického uhlíka (OC) v pôde,

— BAF (vyjadrený v kg pôdy·kg^{-1} červov), konštanta rýchlosti absorpcie pôdy k_s (vyjadrená v g pôdy kg^{-1} červov $deň^{-1}$) a konštanta rýchlosti eliminácie k_e (vyjadrená v $deň^{-1}$), BSAF (vyjadrený v kg pôdy OC kg^{-1} obsahu lipidov pri červoch) možno do správy uviesť dodatočne,

▼M4

— ak sa merajú: percentá materskej chemikálie, metabolitov a viazaných rezíduí (t. j. percento testovanej chemikálie, ktoré nemožno extrahovať pomocou bežných metód extrakcie) zistené v pôde a testovacích zvieratách,

— metódy použité na štatistické analýzy údajov.

Hodnotenie výsledkov:

— súlad výsledkov s kritériami platnosti uvedenými v odseku 17,

— neočakávané alebo nezvyčajné výsledky, napr. neúplná eliminácia testovanej chemikálie z testovacích zvierat.

LITERATÚRA

1. Amorim, M. (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ-HCH) in the Enchytraeid Enchytraeus albidus. Diplomová práca, Univerzita Coimbra.

2. ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.

3. ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ASTM International, E1676-04: 26 s.

4. Beek, B., Boehling, S., Bruckmann, U., Franke, C., Joehncke, U., Studinger, G. (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation – New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235 – 276.

5. Belfroid, A., Sikkenk, M., Seinen, W., Van Gestel, C., Hermens, J. (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93 – 99.

6. Belfroid, A., Van Wezel, A., Sikkenk, M., Van Gestel, C., Seinen, W., a Hermens, J. (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25: 154 – 165.

7. Belfroid, A., Meiling, J., Drenth, H., Hermens, J., Seinen, W., Van Gestel, C. (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31: 185 – 191.

8. Bell, A. W. (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902: 1 – 13.

9. Bligh, E. G., a Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Pysiol. 37: 911 – 917.

10. Bouche, M. (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paríž, 671 s

11. Bruns, E., Egeler, Ph., Moser, T., Römbke, J., Scheffczyk, A., Spörlein, P. (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.

12. Bruns, E., Egeler, Ph., Römbke, J., Scheffczyk, A., Spörlein, P. (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). Hydrobiologia 463: 185 – 196.

13. Conder, J. M., a Lanno, R. P. (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*. J. Soils Sediments 3: 13 – 20.

▼M4

14. Connell, D. W., a Markwell, R. D. (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. Chemosphere 20: 91 – 100.

15. Didden, W. A. M. (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. Pedobiologia 37: 2 – 29.

16. Didden, W. (2003). Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., Holandsko, s. 555 – 576.

17. De Boer, J., Smedes, F., Wells, D., Allan, A. (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.

18. Dietrich, D. R., Schmid, P., Zweifel, U., Schlatter, C., Jenni-Eiermann, S., Bachmann, H., Bühler, U., Zbinden, N. (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 29: 140 – 145.

19. Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1907/2006 z 18. decembra 2006 o registrácii, hodnotení, autorizácii a obmedzovaní chemických látok (REACH) a o zriadení Európskej chemickej agentúry, o zmene a doplnení smernice 1999/45/ES a o zrušení nariadenia Rady (EHS) č. 793/93 a nariadenia Komisie (ES) č. 1488/94, smernice Rady 76/769/EHS a smerníc Komisie 91/155/EHS, 93/67/EHS, 93/105/ES a 2000/21/ES (Ú. v. EÚ L 396, 30.12.2006, s. 1).

20. Edwards, C. A., a Bohlen, P. J. (1996). Biology and ecology of earthworms. Tretie vydanie, Chapman & Hall, Londýn, 426 s

21. Kapitola C.51 tejto prílohy, Bioakumulácia pri bentických máloštetinavcoch žijúcich v sedimente.

22. Egeler, Ph., Gilberg, D., Scheffczyk, A., Moser, Th., a Römbke, J. (2009). Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: 149 s Dostupné na prevzatie na: http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf.

23. Elmegaard, N., a Jagers op Akkerhuis GAJM (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 s.

24. Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.

25. EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195 – 208.

26. Franke, C. (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? Chemosphere 32: 1897-1905.

27. Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Böhling, S., Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D., Jöhncke, U. (1994). The assessment of bioaccumulation. Chemosphere 29: 1501 – 1514.

28. Füll, C. (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dizertačná práca, Univerzita Mainz, 156 s.

▼M4

29. Füll, C., Schulte, C., Kula, C. (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF – Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78 – 84.

30. Gabric, A. J., Connell, D. W., Bell, P. R. F. (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24: 1225 – 1231.

31. Gardner, W. S., Frez, W. A., Cichocki, E. A., Parrish, C. C. (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30: 1099 – 1105.

32. Hawker, D. W., a Connell, D. W. (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701 – 707.

33. Hund-Rinke, K., a Wiechering, H. (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. J. Soils Sediments 1: 15 – 20.

34. Hund-Rinke, K., Römbke, J., Riepert, F., Achazi, R. (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. V: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59 – 81.

35. ISO 11268-2 (1998) Kvalita pôdy – účinky znečisťujúcich látok na dážďovky (*Eisenia fetida*). Časť 2: Stanovenie účinkov na reprodukciu.

36. Jaenike, J. (1982). „*Eisenia foetida*“ is two biological species. Megadrilogica 4: 6 – 8.

37. Jager, T. (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 17: 2080 – 2090.

38. Jager, T., Sanchez, P. A., Muijs, B., van der Welde, E., Posthuma, L. (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. Environ. Toxicol. Chem. 19: 953 – 961.

39. Jager, T., Baerselman, R., Dijkman, E., De Groot, A. C., Hogendoorn, E. A., DeJong, A., Kruitbosch, J. A. W., Peijnenburg, W. J. G. M. (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. Environ. Toxicol. Chem. 22: 767 – 775.

40. Jager, T., Fleuren, R. L. J., Hoogendoorn, E., de Korte, G. (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. 37: 3399 – 3404.

41. Janssen, M. P. M., Bruins, A., De Vries, T. H., Van Straalen, N. M. (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305 – 312.

42. Kasprzak, K. (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23: 217 – 232.

43. Khalil, A. M. (1990). Aufnahme und Metabolismus von ^{14}C-Hexachlorbenzol und ^{14}C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dizertačná práca, Univerzita Mníchov, 137 s.

44. Landrum, P. F. (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi.* Environ. Sci. Toxicol. 23: 588 – 595.

45. Marinussen, M. P. J. C., Van der Zee, S. E. A. T. M., De Haan, F. A. M. (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. Ecotox. Environ. Safety 36: 17 – 26.

46. Mount, D. R., Dawson, T. D., Burkhard, L. P. (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegates.* Environ. Toxicol. Chem. 18: 1244 – 1249.

▼**M4**

47. Nendza, M. (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow}/log BCF correlations, In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlín 1990, VCH, Weinheim.

48. Kapitola C.8 tejto prílohy, Toxicita pre dážďovky.

49. Kapitola C.13 tejto prílohy, Biokoncentrácia: prietokový rybí test.

50. Kapitola C.21 tejto prílohy, Pôdne mikroorganizmy: test dusíkovej premeny.

51. Kapitola C.35 tejto prílohy, Test reprodukcie pri *Enchytraeidae*.

52. Kapitola C.36 tejto prílohy, Test reprodukcie pri dážďovkách

53. Kapitola C.51 tejto prílohy: Bioakumulácia pri bentických máloštetinavcoch žijúcich v sedimente.

54. Petersen, H., a Luxton, M. (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. Oikos 39: 287 – 388.

55. Phillips, D. J. H. (1993). Bioaccumulation. In: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378 – 396.

56. Pflugmacher, J. (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffzienten UWSF- Z. Umweltchem. Ökotox. 4: 77 – 81.

57. Posthuma, L., Weltje, L., Anton-Sanchez, F. A. (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida.* RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.

58. Randall, R. C., Lee, II H., Ozretich, R. J., Lake, J. L., Pruell, R. J. (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. Environ.Toxicol. Chem. 10: 1431 – 1436.

59. Römbke, J., Egele, P., Füll, C. (1998). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 s

60. Römbke, J., a Moser, Th. (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: 373 s

61. Römbke, J., Riepert, F., Achazi, R. (2000). Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105 – 129.

62. Romijn, C. A. F. M., Luttik, R., Van De Meent, D., Slooff, W.,Canton, J. H. (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. Ecotox. Envir. Safety 27: 107 – 127.

63. Sample, B. E., Suter, D. W., Beauchamp, J. J., Efroymson, R. A. (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. Environ. Toxicol. Chem. 18: 2110 – 2120.

64. Schlosser, H.-J., a Riepert, F. (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (Gamasina), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. Zool. Beitr. NF 34: 413 – 433.

65. Schmelz, R., a Collado, R. (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). Carolinea 57: 93 – 100.

▼M4

66. Sims, R. W., a Gerard, B. M. (1985). Earthworms, In: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. Londýn: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.

67. Sousa, J. P., Loureiro, S., Pieper, S., Frost, M., Kratz, W., Nogueira, A. J. A., Soares, A. M. V. M. (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. Environ. Toxicol. Chem. 19: 2557 – 2563.

68. Spacie, A., a Hamelink, J. L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environ. Toxicol. Chem. 1, 309 – 320.

69. Stephenson, G. L., Kaushik, A., Kaushik, N. K., Solomon, K. R., Steele, T., Scroggins, R. P. (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Advances in earthworm ecotoxicology. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67 – 81.

70. Sterenborg, I., Vork, N. A., Verkade, S. K., Van Gestel, C. A. M., Van Straalen, N. M. (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta.* Environ. Toxicol. Chemistry 22: 1167 – 1171.

71. UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation – Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlín.

72. US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Druhé vydanie, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, marec 2000.

73. Van Brummelen, T. C., a Van Straalen, N. M. (1996). Uptake and elimination of benzoa)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber.* Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31: 277 – 285.

74. Van Gestel, C. A. M. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In: Ecotoxicology of Earthworms (Ed. Becker, H., Edwards, P. J., Greig-Smith, P. W., a Heimbach, F.). Intercept Press, Andover (GB).

75. Van Gestel, C. A., a Ma, W.-C. (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. Chemosphere 21: 1023 – 1033.

76. Van Straalen, N. M., Donker, M. H., Vijver, M. G., van Gestel, C. A. M. (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. Environmental Pollution 136: 409 – 417.

77. Venter, J. M., a Reinecke, A. J. (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). South African J. Zool. 23: 161 – 165.

78. Vijver, M. G., Vink, J. P. M., Jager, T., Wolterbeek, H. T., van Straalen, N. M., van Gestel, C. A. M. (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. Soil Biol, Biochem. 37: 1843 – 1851.

79. Widianarko, B., a Van Straalen, N. M. (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, Environ. Toxicol. Chem. 15: 402 – 406.

▼M4

Dodatok 1

VYMEDZENIE POJMOV

Bioakumulácia je zvyšovanie koncentrácie testovanej chemikálie v alebo na organizme vzhľadom na koncentráciu testovanej chemikálie v okolitom médiu. Bioakumulácia je dôsledkom procesov biokoncentrácie a biomagnifikácie (pozri ďalej).

Biokoncentrácia je zvyšovanie koncentrácie testovanej chemikálie v alebo na organizme, ktoré je dôsledkom absorpcie chemikálie výlučne z okolitého média (t. j. prostredníctvom povrchu tela a požitej pôdy), vzhľadom na koncentráciu testovanej chemikálie v okolitom médiu.

Biomagnifikácia je zvyšovanie koncentrácie testovanej chemikálie v alebo na organizme, ktoré je dôsledkom hlavne absorpcie z kontaminovanej potravy alebo koristi, vzhľadom na koncentráciu testovanej chemikálie v potrave alebo koristi. Biomagnifikácia môže viesť k prenosu alebo akumulácii testovanej látky v rámci potravinového reťazca.

Eliminácia testovanej chemikálie je strata tejto chemikálie z tkaniva testovacieho organizmu aktívnymi alebo pasívnymi procesmi, ku ktorým dochádza bez ohľadu na prítomnosť alebo neprítomnosť testovanej látky v okolitom médiu.

Bioakumulačný faktor (BAF) v akomkoľvek čase počas fázy absorpcie tohto testu bioakumulácie je koncentrácia testovanej chemikálie v/na testovacom organizme (C_a v $g \cdot kg^{-1}$ suchej hmotnosti červov) vydelená koncentráciou chemikálie v okolitom médiu (C_s ako $g \cdot kg^{-1}$ suchej hmotnosti pôdy); jednotkou BAF je kg pôdy$\cdot kg^{-1}$ červov.

Rovnovážny bioakumulačný faktor (BAF_{ss}) je BAF v rovnovážnom stave a v priebehu dlhšieho obdobia sa výrazne nemení, pričom koncentrácia testovanej chemikálie v okolitom médiu (C_s ako g kg^{-1} suchej hmotnosti pôdy) je počas tohto obdobia konštantná.

Bioakumulačné faktory vypočítané priamo na základe pomeru konštanty rýchlosti absorpcie pôdy a konštanty rýchlosti eliminácie (k_s a k_e, pozri ďalej) sa označujú ako kinetický bioakumulačný faktor (BAF_K).

Akumulačný faktor bioty k pôde (BSAF) je koncentrácia testovanej chemikálie v/na testovacom organizme normalizovaná na lipidy vydelená koncentráciou testovanej chemikálie v pôde v rovnovážnom stave normalizovanou na organický uhlík. C_a je potom vyjadrená ako $g \cdot kg^{-1}$ obsahu lipidov v organizme a C_s ako $g \cdot kg^{-1}$ organického obsahu pôdy; jednotkou BSAF je kg OC$\cdot kg^{-1}$ lipidov.

Rovnováha alebo **rovnovážny stav** sa vymedzuje ako rovnováha medzi procesmi absorpcie a eliminácie, ku ktorým dochádza súčasne počas fázy expozície. Rovnovážny stav nastáva pri grafickom znázornení závislosti BAF od času vtedy, keď sa priebeh krivky stáva paralelný s časovou osou a tri po sebe idúce analýzy BAF uskutočnené na vzorkách odobratých minimálne v dvojdňových intervaloch sa od seba neodlišujú o viac ako 20 % a ak medzi týmito tromi obdobiami odberu vzoriek neexistujú štatisticky významné rozdiely. V prípade testovaných chemikálie, ktoré sa vstrebávajú pomalšie, sú vhodnejšie intervaly v trvaní sedem dní (49).

Rozdeľovací koeficient organický uhlík – voda (K_{oc}) je pomer koncentrácie chemikálie v/na zlomku pôdy tvorenom organickým uhlíkom a koncentrácie chemikálie vo vode v rovnováhe.

Rozdeľovací koeficient oktanol – voda (K_{ow}) je pomer rozpustnosti chemikálie v n-oktanole a vo vode v rovnováhe, niekedy vyjadrený aj ako P_{ow}. Dekadický logaritmus K_{ow} (log K_{ow}) sa používa na vyjadrenie potenciálu chemikálie na bioakumuláciu vo vodných živočíchoch.

▼M4

Fáza absorpcie alebo expozície je čas, počas ktorého sú testovacie organizmy vystavené pôsobeniu testovanej chemikálie.

Konštanta rýchlosti absorpcie pôdy (k_s) je číselná hodnota vyjadrujúca rýchlosť zvyšovania koncentrácie testovanej látky v/na testovacom organizme v dôsledku absorpcie z pôdnej fázy; k_s je vyjadrená v g pôdy kg^{-1} červov d^{-1}.

Fáza eliminácie je čas nasledujúci po prenose testovacích organizmov z kontaminovaného média do média bez obsahu testovanej látky, počas ktorého sa skúma eliminácia (alebo čistá strata) chemikálie z testovacích organizmov.

Konštanta rýchlosti eliminácie (k_e) je číselná hodnota vyjadrujúca rýchlosť znižovania koncentrácie testovanej látky v/na testovacom organizme po prenose testovacích organizmov z média obsahujúceho testovanú látku do média bez obsahu testovanej látky; k_e je vyjadrená v d^{-1}.

Testovaná chemikália: akákoľvek látka alebo zmes testovaná pomocou tejto testovacej metódy.

▼M4

Dodatok 2

Výpočet parametrov absorpcie a eliminácie

Hlavným parametrom testu bioakumulácie je bioakumulačný faktor, BAF. Meraný BAF možno vypočítať tak, že koncentrácia v testovacom organizme, C_a, sa vydelí koncentráciou v pôde, C_s, v rovnovážnom stave. Ak sa počas fázy absorpcie nedosiahne rovnovážny stav, BAF_K sa vypočíta z konštánt rýchlosti, nie z BAFss. Treba však uviesť, či je BAF založený na koncentráciách v rovnovážnom stave alebo nie.

Zvyčajným prostriedkom stanovovania kinetického bioakumulačného faktora (BAF_K), konštanty rýchlosti absorpcie pôdy (k_s) a konštanty rýchlosti eliminácie (k_e) je použitie nelineárnych metód odhadovania parametrov na počítači, napr. na základe modelov opísaných v odkaze (68). Vzhľadom na súbor sekvenčných údajov o koncentrácii v závislosti od času a modelové rovnice:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[rovnica 1]}$$

alebo

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \quad t > t_c \qquad \text{[rovnica 2]}$$

kde

C_a = koncentrácia chemikálie v červoch [g kg^{-1} čerstvej alebo suchej hmotnosti],

k_s = konštanta rýchlosti absorpcie v tkanivách [g pôdy kg^{-1} červov d^{-1}],

C_s = koncentrácia chemikálie v pôde [g kg^{-1} čerstvej alebo suchej hmotnosti],

k_e = konštanta rýchlosti eliminácie [d^{-1}],

t_c = čas na konci fázy absorpcie,

tieto počítačové programy počítajú hodnoty BAF_K, k_s a k_e.

Ak sa koncentrácia v pozadí pri neexponovaných červoch, napr. v deň 0, výrazne líši od nuly (to môže nastať napr. v prípade kovov), daná koncentrácia v pozadí ($C_{a,0}$) by sa mala zahrnúť do týchto rovníc, ktoré budú mať takúto podobu:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k}e^{t}) \quad 0 < t < t_c \qquad \text{[rovnica 3]}$$

a

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s(e^{-k}e^{(t-tc)} - e^{-k}e^{t}) \qquad t > t_c \qquad \text{[rovnica 4]}$$

V prípadoch, keď je pozorovaný výrazný priebežný pokles koncentrácie testovacej chemikálie v pôde počas fázy absorpcie, možno použiť tieto modely, napr. (67) (79):

$$C_s = C_0(e^{-k_0 t}) \qquad \text{[rovnica 5]}$$

▼M4

kde

C_s = koncentrácia chemikálie v pôde [g kg^{-1} čerstvej alebo suchej hmotnosti],

k_0 = konštanta rýchlosti degradácie v pôde [d^{-1}],

C_0 = počiatočná koncentrácia chemikálie v pôde [g kg^{-1} čerstvej alebo suchej hmotnosti],

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[rovnica 6]}$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 tc} - e^{-k} e^{tc} * e^{-k(t-tc)} \qquad t > t_c \qquad \text{[rovnica 7]}$$

kde

C_a = koncentrácia chemikálie v červoch [g kg^{-1} čerstvej alebo suchej hmotnosti],

k_s = konštanta rýchlosti absorpcie v tkanivách [g pôdy kg^{-1} červov d^{-1}],

k_0 = konštanta rýchlosti degradácie v pôde [d^{-1}],

k_e = konštanta rýchlosti eliminácie [d^{-1}],

t_c = čas na konci fázy absorpcie.

Ak sa počas fázy absorpcie dosiahne rovnovážny stav (t. j. $t = \infty$), rovnicu 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s(1 - e^{-k} e^{t}) \qquad 0 < t < t_c \qquad \text{[rovnica 1]}$$

možno zredukovať na:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

alebo

$$C_a / C_s = k_s / k_e = BAF_K \qquad \text{[rovnica 8]}$$

Potom k_s/k_e x C_s je prístup ku koncentrácii testovanej látky v tkanivách červov v rovnovážnom stave ($C_{a,ss}$).

Akumulačný faktor bioty k pôde (BSAF) možno vypočítať takto:

$$BSAF = BAF_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \qquad \text{[rovnica 9]}$$

kde f_{oc} je frakcia pôdneho organického uhlíka a f_{lip} je frakcia lipidov z červov, podľa možnosti obe stanovené zo vzoriek odobratých počas testu a na základe suchej hmotnosti alebo čerstvej hmotnosti.

Kinetiku eliminácie možno modelovať na základe údajov z fázy eliminácie a s využitím tejto modelovej rovnice a počítačovej metódy odhadovania nelineárnych parametrov. Ak dátové body zakreslené v závislosti od času poukazujú na konštantný exponenciálny pokles koncentrácie testovanej látky pri zvieratách, na opísanie časového priebehu eliminácie možno použiť jednokompartmentový model (rovnica 9).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k} e^{t} \qquad \text{[rovnica 10]}$$

▼**M4**

Procesy eliminácie sa niekedy javia ako dvojfázové, pričom počas počiatočných fáz vykazujú rýchly pokles C_a, ktorý prechádza v pomalšiu stratu testovaných látok v neskorších fázach eliminácie, napr. (27) (68). Dve fázy možno interpretovať s využitím predpokladu, že v organizme, z ktorého sa testovaná látka stráca rôznymi rýchlosťami, existujú dva rôzne kompartmenty. V týchto prípadoch je potrebné si preštudovať konkrétnu literatúru, napr. (38) (39) (40) (78).

Pomocou uvedených modelových rovníc možno kinetické parametre (k_s a k_e) vypočítať aj v jednom kole použitím modelu kinetiky prvého rádu na všetky údaje z fázy absorpcie aj eliminácie súčasne. Opis metódy, ktorá umožňuje takýto kombinovaný výpočet konštánt rýchlostí absorpcie a eliminácie, možno nájsť v odkazoch 41, 73 a 70.

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s(1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1)\right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s(e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2)\right] \qquad \text{[rovnica 11]}$$

Poznámka: Ak sa parametre absorpcie a eliminácie odhadujú súčasne z kombinovaných údajov o absorpcii a eliminácii, premenná „m“ uvedená v rovnici 11 je deskriptor, ktorý umožňuje počítačovému programu priradiť podpojmy rovnice k súborom údajov z príslušnej fázy a vykonať správne hodnotenie (m = 1 pre fázu absorpcie; m = 2 pre fázu eliminácie).

Tieto modelové rovnice by sa však mali používať opatrne, najmä ak počas testu dôjde k zmenám v biodostupnosti alebo (bio)degradácie testovanej chemikálie [pozri napr. (79)].

▼M4

Dodatok 3

PRÍKLADY HARMONOGRAMOV TESTOV BIOAKUMULÁCIE V PÔDE

Test s dážďovkami

a) Fáza absorpcie s použitím ôsmich dní odberu vzoriek na výpočet kinetiky

Deň	Činnosť
– 6	aklimatizácia pripravenej pôdy počas 48 h;
– 4	obohatenie pôdnej frakcie s roztokom testovanej chemikálie; odparenie akéhokoľvek rozpúšťadla; miešanie pôdnych zložiek; rozdelenie pôdy do testovacích nádob; vyvažovanie v testovacích podmienkach počas štyroch dní (troch týždňov v prípade pôdy obohatenej kovmi);
– 3 až – 1	separácia testovacích organizmov z kultúry na aklimatizáciu; príprava a zvlhčovanie pôdnych zložiek;
0	meranie teploty a pH pôdy; odstránenie pôdnych vzoriek z ošetrených nádob a kontrol rozpúšťadla na stanovenie koncentrácie testovanej chemikálie; pridanie prídelu potravy; váženie a náhodné rozdelenie červov do testovacích nádob; zachovanie dostatočných podvzoriek červov na stanovenie analytických hodnôt pozadia, čerstvej a suchej hmotnosti a obsahu lipidov; váženie všetkých testovacích nádob na kontrolu vlhkosti pôdy; kontrola prívodu vzduchu, ak sa používa uzavretý testovací systém;
1	kontrola prívodu vzduchu, zaznamenanie správania červov a teploty; odber vzoriek pôdy a červov na stanovenie koncentrácie testovanej látky;
2	rovnako ako deň 1;
3	kontrola prívodu vzduchu, správania červov a teploty;
4	rovnako ako deň 1;
5 – 6	rovnako ako deň 3;
7	rovnako ako deň 1; pridanie prídelu potravy; kontrola vlhkosti pôdy opätovným odvážením testovacích nádob a kompenzáciou odparenej vody;
8 – 9	rovnako ako deň 3;
10	rovnako ako deň 1;
11 – 13	rovnako ako deň 3;
14	rovnako ako deň 1; pridanie prídelu potravy; kontrola vlhkosti pôdy opätovným odvážením testovacích nádob a kompenzáciou odparenej vody;
15 – 16	rovnako ako deň 3;
17	rovnako ako deň 1;
18 – 20	rovnako ako deň 3;

▼M4

Deň	Činnosť
21	rovnako ako deň 1; meranie teploty a pH pôdy; kontrola vlhkosti pôdy opätovným odvážením testovacích nádob; koniec fázy absorpcie; prenos červov zo zvyšných exponovaných replikátov do nádob obsahujúcich čistú pôdu pre fázu eliminácie (bez vyprázdnenia tráviaceho traktu); odber vzoriek pôdy a červov z kontrol rozpúšťadla.
	Činnosti pred expozíciou (fáza vyvažovania) by sa mali naplánovať tak, aby boli zohľadnené vlastnosti testovanej chemikálie.
	Činnosti opísané pre deň 3 by sa mali vykonávať denne (aspoň cez pracovné dni).

b) Fáza eliminácie

Deň	Činnosť
– 6	príprava a zvlhčovanie pôdnych zložiek; aklimatizácia pripravenej pôdy počas 48 h;
– 4	miešanie pôdnych zložiek; rozdelenie pôdy do testovacích nádob; inkubácia v testovacích podmienkach počas štyroch dní;
0 (koniec fázy absorpcie)	meranie teploty a pH pôdy; váženie a náhodné rozdelenie červov do testovacích nádob; pridanie prídelu potravy; prenos červov zo zvyšných exponovaných replikátov do nádob obsahujúcich čistú pôdu; odber vzoriek pôdy a červov po 4 – 6 h na stanovenie koncentrácie testovanej chemikálie;
1	kontrola prívodu vzduchu, zaznamenanie správania červov a teploty; odber vzoriek pôdy a červov na stanovenie koncentrácie testovanej chemikálie;
2	rovnako ako deň 1;
3	kontrola prívodu vzduchu, správania červov a teploty;
4	rovnako ako deň 1;
5 – 6	rovnako ako deň 3;
7	rovnako ako deň 1; pridanie prídelu potravy; kontrola vlhkosti pôdy opätovným odvážením testovacích nádob a kompenzáciou odparenej vody;
8 – 9	rovnako ako deň 3;
10	rovnako ako deň 1;
11 – 13	rovnako ako deň 3;
14	rovnako ako deň 1; pridanie prídelu potravy; kontrola vlhkosti pôdy opätovným odvážením testovacích nádob a kompenzáciou odparenej vody;
15 – 16	rovnako ako deň 3;
17	rovnako ako deň 1;

▼**M4**

Deň	Činnosť
18 – 20	rovnako ako deň 3;
21	rovnako ako deň 1; meranie teploty a pH pôdy; kontrola vlhkosti pôdy opätovným odvážením testovacích nádob; odber vzoriek pôdy a červov z kontrol rozpúšťadla.
	Príprava pôdy pred začiatkom fázy eliminácie by mala byť rovnaká ako pred fázou absorpcie.
	Činnosti opísané pre deň 3 by sa mali vykonávať denne (aspoň cez pracovné dni).

Test s *Enchytraeidae*

a) Fáza absorpcie s použitím ôsmich dní odberu vzoriek na výpočet kinetiky

Deň	Činnosť
– 6	aklimatizácia pripravenej pôdy počas 48 h;
– 4	obohatenie pôdnej frakcie s roztokom testovanej chemikálie; odparenie akéhokoľvek rozpúšťadla; miešanie pôdnych zložiek; rozdelenie pôdy do testovacích nádob; vyvažovanie v testovacích podmienkach počas štyroch dní (troch týždňov v prípade pôdy obohatenej kovmi);
– 3 až – 1	separácia testovacích organizmov z kultúry na aklimatizáciu; príprava a zvlhčovanie pôdnych zložiek;
0	meranie teploty a pH pôdy; odstránenie pôdnych vzoriek z ošetrených nádob a kontrol rozpúšťadla na stanovenie koncentrácie testovanej chemikálie; pridanie prídelu potravy do pôdy; váženie a náhodné rozdelenie červov do testovacích nádob; zachovanie dostatočných podvzoriek červov na stanovenie analytických hodnôt pozadia, čerstvej a suchej hmotnosti a obsahu lipidov; váženie všetkých testovacích nádob na kontrolu vlhkosti pôdy; kontrola prívodu vzduchu, ak sa používa uzavretý testovací systém;
1	kontrola prívodu vzduchu, zaznamenanie správania červov a teploty; odber vzoriek pôdy a červov na stanovenie koncentrácie testovanej látky;
2	rovnako ako deň 1;
3	kontrola prívodu vzduchu, správania červov a teploty;
4	rovnako ako deň 1;
5 – 6	rovnako ako deň 3;
7	rovnako ako deň 1; pridanie prídelu potravy do pôdy; kontrola vlhkosti pôdy opätovným odvážením testovacích nádob a kompenzáciou odparenej vody;
9	rovnako ako deň 1;
10	rovnako ako deň 3;

▼**M4**

Deň	Činnosť
11	rovnako ako deň 1;
12 – 13	rovnako ako deň 3;
14	rovnako ako deň 1; pridanie prídelu potravy do pôdy; meranie teploty a pH pôdy; kontrola vlhkosti pôdy opätovným odvážením testovacích nádob; koniec fázy absorpcie; prenos červov zo zvyšných exponovaných replikátov do nádob obsahujúcich čistú pôdu pre fázu eliminácie (bez vyprázdnenia tráviaceho traktu); odber vzoriek pôdy a červov z kontrol rozpúšťadla.
	Činnosti pred expozíciou (fáza vyvažovania) by sa mali naplánovať tak, aby boli zohľadnené vlastnosti testovanej chemikálie.
	Činnosti opísané pre deň 3 by sa mali vykonávať denne (aspoň cez pracovné dni).

▼M4

Dodatok 4

Umelá pôda – odporúčania týkajúce sa prípravy a skladovania

Keďže prírodné pôdy z konkrétneho zdroja nemusia byť k dispozícii po celý rok a autochtónne organizmy, ako aj prítomnosť znečisťujúcich mikrolátok môže ovplyvniť test, v tomto teste sa odporúča použiť umelý substrát, umelú pôdu podľa kapitoly C.8 tejto prílohy, Toxicita pre dážďovky (48). V takejto pôde môžu prežiť, rásť a rozmnožovať sa viaceré testovacie druhy a je zabezpečená maximálna štandardizácia, ako aj intra- a interlaboratórna porovnateľnosť testovacích a kultivačných podmienok.

Pôdne zložky

Rašelina:	10 %	Rašelinníková rašelina, podľa usmernenia OECD 207 (48)
Kremenný piesok:	70 %	Priemyselný kremenný piesok (vysušený vzduchom); veľkosť častíc: viac ako 50 % častíc by malo mať veľkosť v rozsahu 50 – 200 μm, ale všetky častice by mali byť ≤ 2 mm
Kaolín:	20 %	Obsah kaolinitu ≥ 30 %
Uhličitan vápenatý:	≤ 1 %	$CaCO_3$, rozomletý na prach, chemicky čistý

Obsah organického uhlíka v umelej pôde možno prípadne znížiť, napr. znížením obsahu rašeliny na 4 – 5 % suchej pôdy a zodpovedajúcim zvýšením obsahu piesku. V dôsledku takéhoto zníženia obsahu organického uhlíka sa môžu znížiť možnosti adsorpcie testovanej chemikálie na pôde (organický uhlík) a dostupnosť testovanej chemikálie pre červy sa môže zvýšiť (74). Preukázalo sa, že druhy *Enchytraeus albidus* a *Eisenia fetida* môžu splniť kritéria platnosti týkajúce sa reprodukcie, ak sa testujú v poľných pôdach s nižším obsahom organického uhlíka, napr. 2,7 % (33), 61, a na základe skúseností možno tento výsledok dosiahnuť aj v umelej pôde, ktorá obsahuje 5 % rašeliny.

Príprava

Suché zložky pôdy sa dôkladne zmiešajú (napr. vo veľkokapacitnom laboratórnom miešači). Zložky sa zmiešajú približne týždeň pred začiatkom testu. Zmiešané suché pôdne zložky sa zvlhčia deionizovanou vodou najmenej 48 hodín pred aplikáciou testovanej látky, aby sa vyvážila/stabilizovala kyslosť. Na stanovenie pH zmesi pôdy sa používa roztok 1 M KCl v pomere 1: 5. Ak hodnota pH nie je v požadovanom rozmedzí (6,0 ± 0,5), do pôdy sa pridá dostatočné množstvo $CaCO_3$ alebo sa pripraví nová várka pôdy.

Maximálna retenčná kapacita vody (WHC) umelej pôdy sa určí podľa ISO 11268-2 (35). Najmenej dva dni pred začiatkom testu sa suchá umelá pôda zvlhčí pridaním dostatočného množstva deionizovanej alebo rekonštituovanej vody, aby sa získala približne polovica konečného obsahu vody. Konečný obsah vody by mal predstavovať 40 – 60 % maximálnej WHC. Na začiatku testu sa predvlhčená pôda rozdelí na toľko várok, koľko je testovacích koncentrácií a kontrol použitých v teste, a obsah vlhkosti sa pomocou roztoku testovanej látky a/alebo pridaním deionizovanej alebo rekonštituovanej vody upraví na 40 – 60 % WHC_{max}. Obsah vlhkosti sa stanoví na začiatku a na konci testu (pri teplote 105 °C). Mal by optimálne zodpovedať požiadavkám jednotlivých druhov (obsah vlhkosti možno skontrolovať aj takto: keď sa pôda jemne stlačí v ruke, medzi prstami by sa mali objaviť malé kvapky vody).

▼M4

Skladovanie

Suché zložky umelej pôdy možno až do použitia skladovať pri izbovej teplote. Pripravená predvlhčená pôda sa pred obohatením môže skladovať na chladnom mieste počas až troch dní. Je potrebné dbať na to, aby sa minimalizovalo odparovanie vody. Pôda obohatená o testovanú látku by sa mala ihneď použiť, pokiaľ nie sú k dispozícii informácie, podľa ktorých možno konkrétnu pôdu skladovať bez toho, aby to malo vplyv na toxicitu a biodostupnosť testovanej látky. Vzorky obohatenej pôdy sa môžu do analýzy uskladniť v podmienkach odporúčaných pre konkrétnu testovanú látku.

▼M4

Dodatok 5

Odporúčané druhy suchozemských máloštetinavcov na testovanie bioakumulácie z pôdy

Dážďovky

Odporúčaný testovací druh je *Eisenia fetida* (Savigny 1826) patriaci do čeľade *Lumbricidae*. Od roku 1972 sa delí na dva poddruhy [*Eisenia fetida* a *Eisenia andrei* (10)]. Podľa Jaenikeho (36) ide v skutočnosti o dva samostatné druhy. *Eisenia fetida* sa ľahko rozpozná podľa svetlých intersegmentálnych žltých pásikov, zatiaľ čo *Eisenia andrei* má jednotné tmavočervené zafarbenie. Tieto druhy pravdepodobne pochádzajú z oblasti Čierneho mora a v súčasnosti sú rozšírené na celom svete, najmä v antropogénne modifikovaných biotopoch, ako sú haldy kompostu. Oba druhy možno použiť na ekotoxikologické aj bioakumulačné testy.

Eisenia fetida a *Eisenia andrei* sú komerčne dostupné, napr. ako návnady na ryby. V porovnaní s inými dážďovkovitými červami majú krátky životný cyklus, pričom dospelosť dosahujú približne v dvoch až troch mesiacoch (pri izbovej teplote). Ich optimálna teplota je približne 20 – 24 °C. Majú radšej pomerne vlhké substráty s takmer neutrálnym pH a vysokým obsahom organického materiálu. Keďže tieto druhy sa vo veľkej miere využívajú v štandardizovaných ekotoxikologických testoch približne 25 rokov, ich kultivácia je zaužívaná (48) (77).

Oba druhy možno chovať v širokej škále živočíšnych odpadov. Chovné médium, ktoré sa odporúča podľa ISO (35), je zmes konského alebo dobytčieho hnoja a rašeliny v pomere 50: 50. Médium by malo mať hodnotu pH 6 – 7 (regulovaná pomocou uhličitanu vápenatého), nízku iónovú vodivosť (menej ako 6 mS/cm alebo menej ako 0,5 % koncentrácie soli) a nemalo by byť nadmerne kontaminované amoniakom alebo zvieracím močom. Možno použiť aj komerčnú záhradnú pôdu bez prísad alebo umelú pôdu podľa OECD (48) alebo zmes oboch pôd v pomere 50: 50. Substrát by mal byť vlhký, ale nie príliš mokrý. Vhodné sú chovné boxy s objemom 10 – 50 litrov.

Na získanie červov štandardného veku a hmotnosti je najlepšie začať kultiváciou kokónov. Dospelé červy sa preto pridajú do chovného boxu obsahujúceho čerstvý substrát na tvorbu kokónov. Praktické skúsenosti preukázali, že hustota populácie približne 100 dospelých červov na kg substrátu (čerstvá hmotnosť) zabezpečuje dobrú mieru reprodukcie. Po 28 dňoch sa dospelé červy odoberú. Dážďovky vyliahnuté z kokónov sa použijú na testovanie, keď dosiahnu dospelosť, aspoň po dvoch mesiacoch, ale pred uplynutím 12 mesiacov.

Červy opísaných druhov možno považovať za zdravé, keď sa pohybujú v substráte, nesnažia sa opustiť substrát a priebežne sa rozmnožujú. Veľmi pomalý pohyb alebo žltá zadná časť (v prípade *Eisenia fetida*) znamená vyčerpanie substrátu. V takom prípade sa odporúča čerstvý substrát a/alebo nižší počet zvierat v boxe.

Ďalšie vybraté odkazy

Gerard, B. M. (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. Londýn, 6: 1 – 58.

Graff, O. (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtsch. 7: 1 – 81.

Römbke, J., Egeler, P., Füll, C. (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 s

Rundgren, S. (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49 – 55.

Satchell, J. E. (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180 – 201.

▼M4

Sims, R. W., a Gerard, B. M. (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. Londýn 31: 1 – 171.

Tomlin, A. D. (1984). The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology – from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, Londýn. 331 – 338 s.

Enchytraeidae

Odporúčaný testovací druh je *Enchytraeus albidus* Henle 1837 (mrlica biela). *Enchytraeus albidus* je jeden z najväčších (až 15mm) druhov obrúčkavých máloštetinavcov čeľade *Enchytraeidae* a vyskytuje sa na celom svete, napr. (8). *Enchytraeus albidus* sa vyskytuje v morských, sladkovodných a suchozemských biotopoch, najmä v rozkladajúcej sa organickej hmote (morské riasy, kompost) a vzácne na lúkach (42). Táto široká ekologická tolerancia a niektoré morfologické variácie poukazujú na skutočnosť, že môže existovať niekoľko rás tohto druhu.

Enchytraeus albidus je komerčne dostupný, predáva sa ako potrava pre ryby. Treba skontrolovať, či kultúra nie je kontaminovaná inými, zvyčajne menšími druhmi (60). Ak dôjde ku kontaminácii, všetky červy by sa mali premyť vodou v Petriho miske. Veľké dospelé jedince druhu *Enchytraeus albidus* sa následne vyberú (pomocou stereomikroskopu) na založenie novej kultúry. Všetky ostatné červy sa zlikvidujú. Životný cyklus tohto druhu je krátky, keďže dospieva od 33 dní (pri teplote 18 °C) do 74 dní (pri teplote 12 °C). V teste možno použiť iba kultúry, ktoré sa udržiavali v laboratóriu bez problémov počas najmenej piatich týždňov (jedna generácia).

Iné druhy rodu *Enchytraeus* sú takisto vhodné, najmä *Enchytraeus luxuriosus.* Tento druh sa fyziologicky vyskytuje v pôde a najnovšie bol opísaný v odkaze (65). Ak sa použijú iné druhy rodu *Enchytraeus*, musia byť jednoznačne identifikované a do správy sa musí uviesť odôvodnenie výberu daného druhu.

Enchytraeus crypticus (Westheide a Graefe 1992) je druh, ktorý patrí do tej istej skupiny ako *Enchytraeus luxuriosus*. Nebolo s istotou zistené, či sa tento druh vyskytuje v poli, a opísaný bol iba z kultúr dážďoviek a háld kompostu (Römbke 2003). Jeho pôvodné ekologické potreby preto nie sú známe. Najnovšie laboratórne štúdie v rôznych poľných pôdach však potvrdili, že tento druh má vysokú toleranciu voči vlastnostiam pôdy, ako je pH a štruktúra (Jänsch a kol. 2005). V posledných rokoch sa tento druh často používa v ekotoxikologických štúdiách pre jednoduchosť chovu a testovania, napr. Kuperman a kol. 2003). Je však malý (3 – 12 mm; 7 mm v priemere (Westheide a Müller 1996), v dôsledku čoho je manipulácia problematickejšia ako v prípade druhu *Enchytraeus albidus*. Ak sa tento druh použije namiesto *Enchytraeus albidus*, veľkosť testovacej nádoby môže, ale nemusí byť menšia. Okrem toho je potrebné zohľadniť, že tento druh sa veľmi rýchlo rozmnožuje, a generačný čas pri teplote 20 ± 2 °C je menej ako 20 dní (Achazi a kol. 1999) alebo pri vyšších teplotách ešte menej.

Enchytraeidae druhu *Enchytraeus albidus* (ako aj iné druhy rodu *Enchytraeus*) možno chovať vo veľkých umelohmotných boxoch (napr. 30 × 60 × 10 cm alebo 20 × 12 × 8 cm, ktorý je vhodný pre kultúry malých červov) naplnených zmesou umelej pôdy a komerčne dostupnej nekontaminovanej záhradnej pôdy bez prísad. Kompostový materiál by sa nemal používať, lebo môže obsahovať toxické chemikálie, ako sú ťažké kovy. Faunu je potrebné z chovnej pôdy pred použitím odstrániť prostredníctvom hlbokého zmrazenia, ktoré sa vykoná trikrát. Možno použiť aj čistú umelú pôdu, ale miera reprodukcie môže byť pomalšia v porovnaní s mierou, ktorá sa dosiahne pomocou zmiešaných substrátov. Hodnota pH substrátu by mala byť 6,0 ± 0,5. Kultúra je uložená v inkubátore pri teplote 15 ± 2 °C bez svetla. V každom prípade treba zabrániť tomu, aby bola teplota vyššia ako 23 °C. Umelá/prírodná pôda by mala byť vlhká, ale nie mokrá. Keď sa pôda jemne stlačí v ruke, mali by sa objaviť iba malé kvapky vody. V každom prípade treba predchádzať anoxickým podmienkam (napr. ak sa použije veko, počet dier vo veku by mal byť dostatočne vysoký, aby zabezpečoval dostatočnú výmenu vzduchu). Chovná pôda by sa mala raz týždenne prevzdušniť dôkladným miešaním.

▼M4

Červy by sa mali kŕmiť najmenej raz týždenne ad libitum ovsenými otrubami, ktoré sa vložia do dutiny na povrchu pôdy a prikryjú pôdou. Ak v nádobe ostala potrava z posledného dňa kŕmenia, množstvo podávanej potravy by sa malo zodpovedajúco upraviť. Ak na zvyšnej potrave rastú huby, mala by sa nahradiť novým množstvom ovsených vločiek. Na stimuláciu reprodukcie možno ovsené vločky každé dva týždne doplniť komerčne dostupným bielkovinovým práškom s vitamínmi. Po troch mesiacoch sa zvieratá prenesú do čerstvo pripravenej kultúry alebo chovného substrátu. Ovsené otruby, ktoré musia byť uskladnené v hermeticky uzavretých nádobách, sa pred použitím autoklávujú alebo zohrejú, aby sa zabránilo infekciám v dôsledku múčnych roztočov (napr. druh *Glyzyphagus*, *Astigmata*, *Acarina*) alebo dravých roztočov (napr. *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, *Gamasida*, *Acarina*). Po dezinfekcii sa potrava zomelie, aby ju bolo možné ľahko rozsypať po povrchu pôdy. Ďalším možným zdrojom potravy sú pekárske kvasnice alebo potrava pre ryby TetraMin®.

Vo všeobecnosti sú kultivačné podmienky dostatočné, ak sa červy nesnažia opustiť substrát, v pôde sa pohybujú rýchlo, majú lesklý vonkajší povrch bez prilepených častíc pôdy a sú viac-menej do biela zafarbené a ak možno pozorovať červy rôzneho veku. Červy možno v skutočnosti považovať za zdravé, ak sa priebežne rozmnožujú.

Ďalšie vybraté odkazy

Achazi, R. K., Fröhlich, E., Henneken, M., Pilz, C. (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117 – 126.

Jänsch, S., Amorim, M. J. B., Römbke, J. (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51 – 83.

Kuperman, R. G., Checkai, R. T., Simini, M., Phillips, C. T., Kolakowski, J. E., Kurnas, C. W., Sunahara, G. I. (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651 – 656.

Römbke, J. (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607 – 616.

Westheide, W., a Graefe, U. (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479 – 488.

Westheide, W., a Müller, M. C. (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263 – 267.